BAND 31, HEFT 1 NOVEMBER 1957

PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

Unter Mitwirkung von

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley, Keswick-Cumberland / Prof. Dr. T. Hemmi, Kyoto / Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler, Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Canberra / Prof. Dr. H. M. Quanjer, Wageningen Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest / Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

herausgegeben von den Professoren

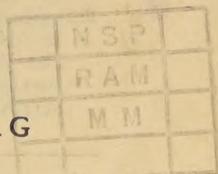
E. Gäumann Zürich

M. Klinkowski Aschersleben

H. Richter Berlin-Dahlem



Mit 19 Abbildungen



1957

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Phytopath. Z. Bd. 31 Heft *1 S. 1—112 Berlin 1957*

Postverlagsort Berlin



INHALT

Abhandlungen

Manuskripte: In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.

„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.

Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

Herausgeber: Prof. Dr. E. GÄUMANN, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. KLINKOWSKI, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. RICHTER, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19.

Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.

Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. RICHTER, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. RICHTER vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

Honorierung: Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

Sonderdrucke: Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 20 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Druckbogen.

Bezugsbedingungen: Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,— DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

Abonnementspreis dieses Heftes 24,— DM **Einzelpreis 26,40 DM**

Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidg. Technischen Hochschule in Zürich

Über den Einfluß der Ernährung auf die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten durch Fusarinsäure[1])

Von

Ernst Gäumann und Elisabeth Bachmann

Mit 6 Abbildungen

Läßt man steigende Konzentrationen von Fusarinsäure (Gäumann, 1957) auf die Protoplasten von *Rhoeo discolor* (L'Hér.) Hance, *Solanum Lycopersicum* L. und *Spirogyra nitida* (Dillwijn) Link einwirken, so durchläuft die Schädigung ihrer Wasserpermeabilität nacheinander zwei Phasen, die durch unterschiedliche Wirkungsgruppen der Fusarinsäure gesteuert werden.

Die erste Phase liegt zwischen den Konzentrationen von rund 10^{-9} und 10^{-5} molar; sie wird durch den Pyridinring gesteuert und kennzeichnet sich durch eine Übersteigerung der Wasserpermeabilität der Protoplasten (Abb. 1, linker Kurvenschenkel), die bei der Konzentration von 10^{-9} molar anhebt, bei der Konzentration von 10^{-7} molar einen Höhepunkt erreicht und bei der Konzentration von 10^{-5} bis 10^{-4} molar wieder verschwindet; wir werden sie im folgenden der Kürze halber als die (im Sinne steigender Konzentrationen) „vorübergehende" Übersteigerung der Wasserpermeabilität der Protoplasten bezeichnen. Sie kehrt bei sämtlichen drei Testpflanzen in ähnlicher Weise wieder und ist somit nicht artspezifisch.

Die zweite Phase setzt bei der Konzentration von rund 10^{-4} molar ein und wird durch die n-Butyl-Gruppe in β-Stellung gesteuert. Sie verläuft artspezifisch; bei den *Rhoeo-* und den Tomatenprotoplasten führt sie zu einer endgültigen Abdichtung (Abb. 1, rechter Kurvenabschnitt), bei den *Spirogyra*-Protoplasten dagegen zu einer endgültigen Übersteigerung der Wasserpermeabilität, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit (Abb. 3) bei den achtfach mit Phosphorsäure überernährten *Rhoeo*-Pflanzen (Bachmann, 1956, 1957; Gäumann und Loeffler, 1957).

[1]) Die vorliegende Arbeit wurde von der Eidg. Volkswirtschaftsstiftung unterstützt; wir möchten ihrem Stiftungsrat auch hier unseren Dank wiederholen.

Leider läßt sich der Einfluß der unterschiedlichen Ernährung auf die Fusarinsäure-Empfindlichkeit der Protoplasten nicht unmittelbar bei unserem Testobjekt für den Welkeeffekt der Fusarinsäure, nämlich an Hand junger Tomatenpflanzen, verfolgen, weil sich Tomatenprotoplasten für Permeabilitätsuntersuchungen schlecht eignen. Wir verwendeten deshalb als Modellbeispiel *Rhoeo discolor*, die sich hinsichtlich der Schädigung der Wasserpermeabilität ihrer Protoplasten durch steigende Konzentrationen von Fusarinsäure gleich verhält wie *Solanum Lycopersicum* (Gäumann und Loeffler, 1957).

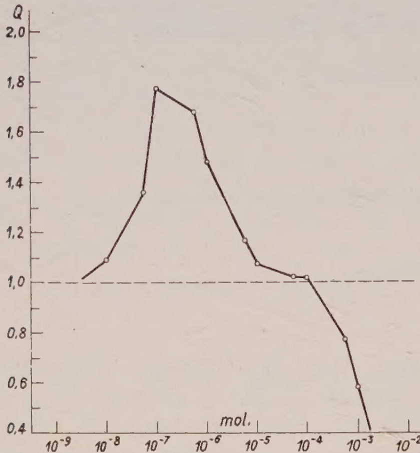


Abb. 1. Die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten normal ernährter Exemplare von *Rhoeo discolor* durch steigende Konzentrationen von Fusarinsäure. Abszisse: Konzentration der applizierten Fusarinsäure in Molaritäten. Ordinate: Verschiebung der Wasserpermeabilität der Protoplasten (Deplasmolysezeit der Kontrollen ohne Toxin dividiert durch die Deplasmolysezeit der Protoplasten nach Behandlung mit Fusarinsäure in der genannten Konzentration; Quotienten über 1 bedeuten deshalb eine Erhöhung, Quotienten unter 1 eine Erniedrigung der Wasserpermeabilität)

Die *Rhoeo*-Pflanzen wurden aus Samen aufgezogen und nach der von Zähner (1955) beschriebenen Methode kultiviert. Abwechslungsweise wurden N, P und K variiert; bei gleichbleibendem P und K wurden 8 N, 1 N, 1/8 und 1/32 N geprüft, bei gleichbleibendem K und N 8 P, 1 P, 1/8, 1/32 und 1/64 P, und bei gleichbleibendem P und N 8 K, 1 K, 1/8, 1/32 und 1/64 K.

Die Schädigung der Wasserpermeabilität der unterschiedlich ernährten *Rhoeo*-Protoplasten durch steigende Konzentrationen von Fusarinsäure wurde nach der von Bachmann (1956) beschriebenen Methode untersucht. Zum Vergleich dient die Schädigungskurve der *Rhoeo*-Pflanzen, die in einer normalen Nährlösung (1 N, 1 P, 1 K) aufgezogen worden waren (Abb. 1).

§ 1 Der Einfluß der unterschiedlichen Stickstoffernährung auf die Schädigung der Wasserpermeabilität

Die achtfache Stickstoffüberernährung hemmt während der ersten Wochen das Wachstum und insbesondere die Wurzelbildung der Versuchspflanzen; dagegen bewirkt sie keine grundsätzliche Verschiebung der Empfindlichkeit ihrer Protoplasten für steigende Konzentrationen von Fusarinsäure: die Kurve 8 N durchläuft in Abbildung 2 bei steigenden Fusarinsäurekonzentrationen sukzessive dieselben zwei Schädigungsphasen wie die Normalkurve in Abbildung 1.

Im Rahmen dieses qualitativ gleichbleibenden Kurvenverlaufes bewirkt dagegen die achtfache Stickstoffüberernährung in der ersten Schädigungsphase, also bei niederen Toxinkonzentrationen, eine quantitative Verminderung der Toxinempfindlichkeit der Protoplasten; denn die vorübergehende Übersteigerung ihrer Wasserpermeabilität setzt in Abbildung 2, Kurve 8 N, erst bei der Konzentration von rund 10^{-6} molar ein statt, wie bei der normalen Ernährung, schon bei 10^{-9} bis 10^{-8} molar. In ähnlicher Weise wird der Höhepunkt der vorübergehenden Übersteigerung der Wasserpermeabilität bei achtfacher Stickstoffüberernährung erst bei der Konzentration von 10^{-4} molar erreicht, gegen 10^{-7} molar bei normaler Stickstoffgabe. Die achtfache Stickstoffüberernährung erhöht somit die Widerstandsfähigkeit der *Rhoeo*-Protoplasten gegen die Schädigung ihrer Wasserpermeabilität durch den Pyridinring der Fusarinsäure um mehr als das Hundertfache, d. h. es braucht im Wirkungsbereich des Pyridinringes rund hundermal mehr Fusarinsäure, um dieselbe Intensität der Schädigung der Wasserpermeabilität auszulösen wie bei normal mit Stickstoff ernährten Exemplaren.

Die zweite Schädigungsphase, die bei höheren Toxinkonzentrationen einsetzt und durch die aliphatische Seitenkette in β-Stellung gesteuert wird, erfährt dagegen durch die achtfache Stickstoffüberernährung keine wesentliche Verschiebung; denn die Abdichtung der Protoplasten beginnt in Abbildung 2, Kurve 8 N, bei der Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ molar, in der Normalkurve (Abb. 1) bei rund 10^{-4} molar, und verläuft in beiden Fällen in einer ähnlichen Steilheit.

Bei Stickstoffunterernährung wachsen die *Rhoeo*-Pflanzen anfänglich rascher als die Kontrollen; von etwa der neunten Woche an bleiben sie zurück und sind gelblich und leicht durchscheinend; ferner fallen sie durch eine allmählich an Intensität zunehmende Übersteigerung der Anthocyanbildung (Rotfärbung) auf.

Wie bei der Stickstoffüberernährung, so wird auch durch die Stickstoffunterernährung die Reaktionslage der *Rhoeo*-Protoplasten gegenüber steigenden Konzentrationen von Fusarinsäure nur im Bereiche der niederen Toxinkonzentrationen, also nur gegenüber dem Pyridinring, verschoben, während sie im Bereiche der höheren Toxinkonzentrationen, also gegenüber der aliphatischen Seitenkette der Fusarinsäure, unbeeinflußt bleibt. Schon die Herabsetzung der Stickstoffgabe auf ein Achtel löscht die Empfindlichkeit der *Rhoeo*-Protoplasten für den Pyridinring der Fusarinsäure aus (Abb. 2, Kurve $^{1}/_{8}$ N). Es ist, als ob in den Protoplasten die Haftpunkte des Pyridinringes verschwunden wären; die Fusarinsäure schädigt deshalb die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten zwischen den Konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-4} molar nicht, sondern ihre schädigende Wirkung setzt erst ein, wenn die Wirkungsschwelle der aliphatischen Seitenkette überschritten wird, also in höheren Konzentrationen. Die Schädigung besteht in dieser zweiten

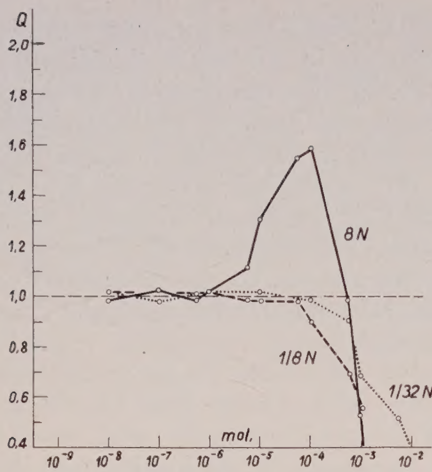


Abb. 2. Der Einfluß der unterschiedlichen Stickstoffernährung auf die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* durch steigende Konzentrationen von Fusarinsäure. Kurve 8 N: Achtfache N-Überernährung. Die Kurve 1 N ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Die Kurven 1/8 und 1/32 N entsprechen $^1/_8$ bzw. $^1/_{32}$ der normalen N-Gabe

Schädigungphase wieder in einer Abdichtung der Protoplasten, die gleich verläuft wie bei der Normalkurve (Abb. 1, rechter Kurvenabschnitt).

Eine noch stärkere Drosselung der Stickstoffversorgung ($^1/_{32}$ N) verschiebt die Empfindlichkeit der *Rhoeo*-Protoplasten für steigende Konzentrationen von Fusarinsäure nicht mehr: Die Kurve $^1/_{32}$ N verläuft in Abbildung 2 gleich wie die Kurve $^1/_8$ N, d. h. die Haftpunkte für den Pyridinring sind und bleiben verschwunden.

§ 2 Der Einfluß der unterschiedlichen Phosphorsäure-Ernährung auf die Schädigung der Wasserpermeabilität

Während die Protoplasten unterschiedlich mit Stickstoff ernährter *Rhoeo*-Pflanzen bei Behandlung mit Fusarinsäure nur gegenüber deren Pyridinring ein verändertes Verhalten zeigen, verschiebt die unterschiedliche Phosphorsäure-Ernährung ihre Reaktionslage gegenüber beiden wirksamen Komponenten der Fusarinsäure, d. h. sowohl gegenüber dem Pyridinring als auch gegenüber der aliphatischen Seitenkette in β-Stellung. Hingegen wird der äußere Habitus der *Rhoeo*-Pflanzen im geprüften Phosphorsäurebereich nicht beeinflußt, ausgenommen durch achtfache Phosphorsäure-Überernährung, wo die Blätter einige dürre Spitzen aufweisen, und durch extremen Phosphorsäuremangel ($^1/_{64}$ P), wo die Pflanzen durch ihre gelbliche Farbe und ihre durchscheinenden Blätter auffallen.

a) Das Verhalten gegen niedere Toxinkonzentrationen (spezifischer Wirkungsbereich des Pyridinringes)

Achtfache Phosphorsäure-Überernährung erhöht die Widerstandsfähigkeit der *Rhoeo*-Protoplasten gegen die Schädigung ihrer Wasserpermeabilität durch den Pyridinring der Fusarinsäure um etwa das Zehnfache; denn die vorübergehende Übersteigerung der Wasserpermeabilität setzt in Abbildung 3 erst bei der Fusarinsäurekonzentration von 10^{-7} molar ein statt, wie normal (Abb. 1), zwischen 10^{-9} und 10^{-8} molar, und sie erreicht ihren Höhepunkt erst bei der Konzentration von $5 \cdot 10^{-6}$ molar

statt, wie normal, bei 10^{-7} oder 10^{-6} molar. Die Widerstandsfähigkeit der *Rhoeo*-Protoplasten gegen die Schädigung ihrer Wasserpermeabilität durch den Pyridinring der Fusarinsäure wird somit durch achtfache Phosphorsäure-Überernährung in gleichem Sinne verschoben wie durch achtfache Stickstoffüberernährung, nur schwächer als bei dieser, nämlich nur um etwa das Zehnfache statt um mehr als das Hundertfache.

Die Rückkehr der Schädigungskurve zur Ausgangslinie (Quotient 1,0) wird dagegen durch die achtfache Phosphorsäure-Überernährung (wie ja auch durch die achtfache Stickstoffüberernährung) nicht beeinflußt: die Kurve 8 P erreicht in Abbildung 3 die Ausgangslinie wieder bei der Konzentration von 10^{-4} molar.

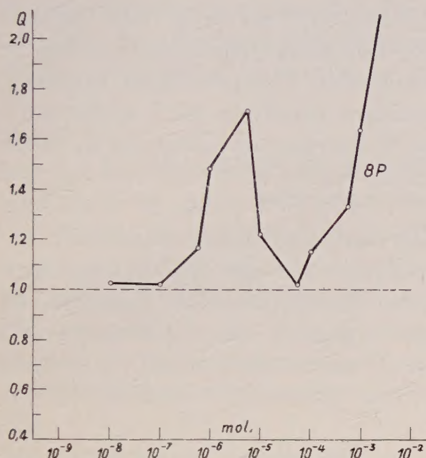


Abb. 3. Der Einfluß achtfacher Phosphorsäure-Überernährung auf die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* durch steigende Konzentrationen von Fusarinsäure

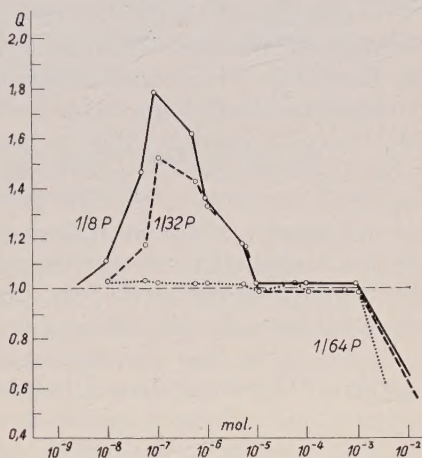


Abb. 4. Der Einfluß der Phosphorsäure-Unterernährung auf die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* durch steigende Konzentrationen von Fusarinsäure. Die Kurven 1/8, 1/32 und 1/64 P entsprechen $^1/_8$, $^1/_{32}$ und $^1/_{64}$ der normalen Phosphorsäuregabe

Auch auf Phosphorsäure-Unterernährung spricht die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten im Wirkungsbereich des Pyridinringes in ähnlicher Weise an wie auf Stickstoffunterernährung, nur wiederum weniger rasch bzw. weniger stark als bei dieser; so wird der Verlauf ihrer Schädigungskurve durch eine Herabsetzung der Phosphorsäurequote auf $^1/_8$ der Normalration noch nicht beeinflußt (Abb. 4, Kurve $^1/_8$ P, im Vergleich zu Abb. 1). Bei Reduktion der Phosphorsäuregabe auf $^1/_{32}$ bleibt sich die Lage des Kurvengipfels gleich, nur das Ausmaß der Übersteigerung der Wasserpermeabilität der Protoplasten nimmt etwas ab (Abb. 4, Kurve $^1/_{32}$ P); und erst bei der Phosphorsäurerate von $^1/_{64}$ (Abb. 4, Kurve $^1/_{64}$ P) wird die vorübergehende Übersteigerung der Wasserpermeabilität der Protoplasten, wie bei der Stickstoffrate von $^1/_8$ N, vollkommen ausgelöscht.

Extreme Phosphorsäure-Unterernährung vermag somit, wie eine Drosselung der Stickstoffgabe auf 1/8 der Normalration, im Sektor der Störung der Wasserpermeabilität die Empfindlichkeit der *Rhoeo*-Protoplasten für niedere Fusarinsäurekonzentrationen vollkommen aufzuheben: Die *Rhoeo*-Protoplasten nehmen in beiden Fällen im Sektor „Störung der Wasserpermeabilität" die in schwacher Konzentration applizierte Fusarinsäure überhaupt nicht mehr zur Kenntnis.

b) Das Verhalten gegen höhere Toxinkonzentrationen (spezifischer Wirkungsbereich der aliphatischen Seitenkette der Fusarinsäure)

Achtfache Phosphorsäure-Überernährung der *Rhoeo*-Protoplasten läßt ihre Reaktion auf höhere Fusarinsäurekonzentrationen in das Gegenteil umschlagen: während normal mit Phosphorsäure ernährte Protoplasten durch Fusarinsäurekonzentrationen oberhalb 10^{-4} molar abgedichtet werden (Abb. 1), wird ihre Wasserpermeabilität durch achtfache Phosphorsäure-Überernährung im selben Konzentrationsbereich in das Gegenteil verschoben, nämlich steil übersteigert (Abb. 3). Zwischen der normalen und der achtfachen Phosphorsäure-Ernährung durchläuft somit die Empfindlichkeit der *Rhoeo*-Protoplasten für die Schädigung ihrer Wasserpermeabilität durch die aliphatische Seitenkette der Fusarinsäure mutmaßlicherweise ein Minimum, in dessen Bereich die Abdichtung der Protoplasten in eine Übersteigerung ihrer Wasserpermeabilität umschlägt; Lage und Charakter dieses Übergangsbereiches müssen erst noch durch besondere Untersuchungen geklärt werden.

Die Wasserpermeabilität der achtfach mit Phosphorsäure überernährten *Rhoeo*-Protoplasten wird somit durch steigende Konzentrationen von Fusarinsäure zweimal in gleichem Sinne geschädigt, wobei jedoch in den beiden Schädigungsphasen unterschiedliche Wirkungsgruppen der Fusarinsäure den Ausschlag geben: bei niederen Toxinkonzentrationen wird ihre Wasserpermeabilität durch den Pyridinring vorübergehend übersteigert; dann folgt im Konzentrationsbereich von 10^{-4} molar ein Kurvenabschnitt, in welchem die Fusarinsäure die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten nicht mehr in meßbarer Weise schädigt, so daß sich die Versuchsprotoplasten gleich verhalten wie die Kontrollen in Leitungswasser; und daran schließt sich bei noch höheren Toxinkonzentrationen eine zweite Schädigungsphase an, in welcher die Wasserpermeabilität erneut, nur diesmal durch die aliphatische Seitenkette und diesmal endgültig, übersteigert wird.

Ein derartiger Kurvenverlauf ist sonst bei den *Rhoeo*-Protoplasten erst einmal beobachtet worden, nämlich bei der Einwirkung steigender Konzentrationen von Coramin, dem Diaethylamid der Nikotinsäure, auf normal ernährte *Rhoeo*-Protoplasten (Bachmann, 1957, Abb. 8; der Einfluß unterschiedlicher Ernährung ist hier noch nicht verfolgt worden); dagegen findet sich ein ähnlicher Kurvenverlauf häufig bei *Spirogyra nitida*, so unter der Einwirkung steigender Konzentrationen von Fusarinsäure und von einigen homologen Pyridinderivaten (Bachmann, 1956, 1957).

P h o s p h o r s ä u r e - U n t e r e r n ä h r u n g bewirkt bei den *Rhoeo*-Protoplasten keine grundsätzliche Verschiebung ihrer Reaktionslage gegenüber der aliphatischen Seitenkette der Fusarinsäure: der rechte Schenkel sämtlicher drei Kurven verläuft in Abbildung 4 grundsätzlich gleich wie in Abbildung 1. Verschoben wird nur der Schwellenwert, in dessen Bereich die Wasserpermeabilitäts-schädigende Wirkung der aliphatischen Seitenkette einsetzt: während die Abdichtung der Protoplasten bei der Normalkurve in Abbildung 1 eindeutig bei der Fusarinsäurekonzentration von 10^{-4} molar beginnt, durchlaufen sämtliche drei Schädigungskurven in Abbildung 4 zwischen den Konzentrationen von 10^{-5} und 10^{-3} molar einen Bereich, innerhalb dessen die Fusarinsäure die Wasserpermeabilität der *Rhoeo*-Protoplasten vorübergehend nicht mehr bzw. noch nicht in meßbarer Weise schädigt. Es wird auch hier besonderer Untersuchungen bedürfen, um den in Frage stehenden Mechanismen näherzukommen.

§ 3 Der Einfluß der unterschiedlichen Kali-Ernährung auf die Schädigung der Wasserpermeabilität

Unterschiedliche Kaligaben sind im Bereiche von 1 K bis $^1/_{64}$ K für die Reaktionslage der *Rhoeo*-Protoplasten gegenüber dem P y r i d i n r i n g der Fusarinsäure bedeutungslos (Beispiel: Abb. 5, Kurve $^1/_{32}$ K). Achtfache Kali-Überernährung steigert dagegen die Widerstandsfähigkeit der *Rhoeo*-Protoplasten in diesem Sektor um rund das Hundertfache: der Höhepunkt der vorübergehenden Übersteigerung der Wasserpermeabilität liegt in Abbildung 5, Kurve 8 K, bei der Fusarinsäurekonzentration von 10^{-5} molar statt, wie in der Normalkurve (Abb. 1), bei 10^{-7} molar; das A u s m a ß der vorübergehenden Übersteigerung der Wasserpermeabilität der Protoplasten wird dagegen durch diese Verschiebung der Fusarinsäure-Empfindlichkeit der Protoplasten nicht berührt.

Die Empfindlichkeit der *Rhoeo*-Protoplasten für die Schädigung ihrer Wasserpermeabilität durch die a l i p h a t i s c h e S e i t e n k e t t e der Fusarinsäure wird weder durch Kali-Unter- noch durch Kali-Überernährung beeinflußt.

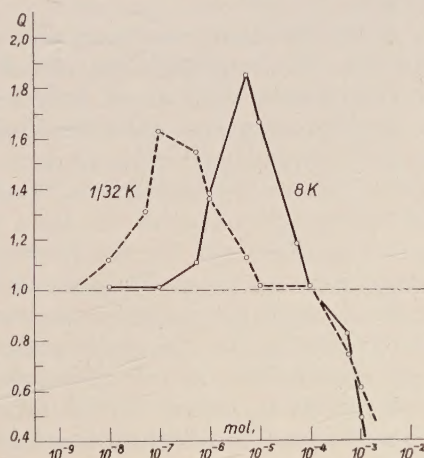


Abb. 5. Der Einfluß der unterschiedlichen K a l i - E r n ä h r u n g auf die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* durch steigende Konzentrationen von Fusarinsäure. K u r v e 8 K: Achtfache Kali-Überernährung. Die K u r v e 1 K ist in Abbildung 1 wiedergegeben. K u r v e 1/32 K: $^1/_{32}$ der normalen Kaligabe

§ 4 Allgemeine Betrachtungen

Die vorliegenden Tastversuche beschränken sich auf ein für Deplasmolyse-Messungen methodisch günstiges Modellobjekt, nämlich *Rhoeo discolor*; da sich aber die *Rhoeo*-Protoplasten hinsichtlich der Schädigung ihrer Wasserpermeabilität durch steigende Konzentrationen von Fusarinsäure gleich verhalten wie die Protoplasten von Tomatenpflanzen, so gelten die an Hand von *Rhoeo discolor* gewonnenen Einsichten mutmaßlicherweise mutatis mutandis auch für Tomatenpflanzen.

Ferner prüften wir bei diesem Modellobjekt nur einen einzigen Funktionsbereich, nämlich die Wasserpermeabilität der Protoplasten; doch haben wir Anlaß zu vermuten, daß sich einige andere Schädigungsbereiche der Fusarinsäure in ähnlicher Weise verhalten.

Das wesentliche Ergebnis der hier besprochenen Versuchsreihen besteht darin, daß unterschiedlich mit Stickstoff, Phosphorsäure bzw. Kali ernährte *Rhoeo*-Pflanzen hinsichtlich der Schädigung ihrer Wasserpermeabilität durch Fusarinsäure sehr unterschiedlich reagieren; doch verändert diese unterschiedliche Ernährung nicht die Empfindlichkeit der *Rhoeo*-Protoplasten für die Fusarinsäuremolekeln als Ganzes, sondern sie verschiebt ihre Reaktionslage gegenüber den beiden Wirkungsgruppen der Fusarinsäuremolekeln, nämlich gegenüber dem Pyridinring und gegenüber der aliphatischen Seitenkette in β-Stellung, in unterschiedlicher Weise.

Die Widerstandsfähigkeit der *Rhoeo*-Protoplasten gegen den Pyridinring der Fusarinsäure (der in niederen Toxinkonzentrationen eine vorübergehende Übersteigerung ihrer Wasserpermeabilität auslöst) wird bei allen drei Nährstoffen durch eine achtfache Überdosierung gesteigert, nämlich bei Stickstoff- bzw. Kali-Überernährung um rund das Hundertfache, bei Phosphorsäure-Überernährung um rund das Zehnfache; es braucht somit im ersten Falle rund hundertmal, im letzten Falle rund zehnmal mehr Fusarinsäure, um denselben Effekt zu erzielen.

Unterernährung mit einem dieser drei Nährstoffe wirkt dagegen unterschiedlich: Die Empfindlichkeit der *Rhoeo*-Protoplasten für den Pyridinring der Fusarinsäure wird durch Kali-Unterernährung (selbst im Ausmaß von $^1/_{64}$ der Normalration) nicht beeinflußt, sondern nur durch Stickstoff- bzw. Phosphorsäuremangel; beide löschen die Empfindlichkeit der *Rhoeo*-Protoplasten für den Pyridinring der Fusarinsäure vollkommen aus, und zwar Stickstoffmangel schon bei der Rate von $^1/_8$, Phosphorsäuremangel dagegen erst bei der Rate von $^1/_{64}$ der Normalration. Es sieht aus, als ob die *Rhoeo*-Protoplasten bei dieser Mangelernährung, obschon ihre Wasserpermeabilität für unser Auge normal weiterbesteht, die spezifischen Rezeptoren für den Pyridinring der Fusarinsäure nicht mehr synthetisieren würden. Wegen dieses Ausscheidens des Pyridinringes sind niedere Konzentrationen von Fusarinsäure bei den mit $^1/_8$ Stickstoff bzw. mit $^1/_{64}$ Phosphorsäure ernährten *Rhoeo*-Pflanzen im Sektor der Schädigung der Wasserpermeabilität der

Protoplasten wirkungslos; Fusarinsäure wirkt bei diesen Objekten erst giftig, wenn die Konzentrationsschwelle für die schädigende Wirkung der aliphatischen Seitenkette überschritten wird.

Da wir weder die Mechanismen kennen, mit welchen die verschiedenen Proteine, Phosphatide usw. die Wasserpermeabilität der Protoplasten steuern, noch die Mechanismen, mit denen der Pyridinring der Fusarinsäure in diesen funktionellen Ablauf eingreift, so vermögen wir diese ernährungsbedingten Verschiebungen in der Empfindlichkeit der *Rhoeo*-Protoplasten für den Pyridinring der Fusarinsäure nicht zu interpretieren. Auffallend ist immerhin, daß der schädigende Effekt des Pyridinringes auf die Wasserpermeabilität der Protoplasten (im Gegensatz zum schädigenden Effekt der aliphatischen Seitenkette) durch keine der hier geprüften Über- und Unterernährungen in sein Gegenteil verkehrt wird: Wenn er eintritt, so besteht er in einer Übersteigerung der Wasserpermeabilität der Protoplasten, nie aber in einer Abdichtung derselben.

Die Reaktionslage der *Rhoeo*-Protoplasten gegenüber der aliphatischen Seitenkette der Fusarinsäure, die in höheren Toxinkonzentrationen die Schädigung der Wasserpermeabilität steuert, wird rein zahlenmäßig durch die unterschiedliche Ernährung mit einem der drei genannten Nährstoffe weniger beeinflußt als ihr Verhalten gegenüber dem Pyridinring der Fusarinsäure; denn von den sechs Möglichkeiten: Stickstoffüber- bzw. unterernährung, Phosphorsäureüber- bzw. unterernährung und Kaliüber- bzw. unterernährung, verschieben fünf die Reaktionslage der *Rhoeo*-Protoplasten gegenüber der aliphatischen Seitenkette der Fusarinsäure überhaupt nicht oder nur unbedeutend; einzig die Phosphorsäure-Überernährung greift in das Schädigungsgeschehen ein und verkehrt den Wirkungssinn der aliphatischen Seitenkette in sein Gegenteil: bei achtfach mit Phosphorsäure überernährten *Rhoeo*-Protoplasten setzt die aliphatische Seitenkette die Wasserpermeabilität nicht herab, sondern übersteigert sie.

Ob zwischen dieser Abdichtung der *Rhoeo*-Protoplasten bei normaler Phosphorsäure-Ernährung und der Übersteigerung ihrer Wasserpermeabilität bei achtfacher Überernährung mit Phosphorsäure ein Ernährungsbereich besteht, in welchem die *Rhoeo*-Protoplasten auf die aliphatische Seitenkette der Fusarinsäure überhaupt nicht ansprechen (so wie sie unter bestimmten Voraussetzungen auf den Pyridinring der Fusarinsäure nicht ansprechen), so daß höhere Konzentrationen von Fusarinsäure hinsichtlich der Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten wirkungslos bleiben, ist noch unbekannt.

Beim natürlichen Krankheitsgeschehen wird sich der unterschiedliche Einfluß der Ernährung auf die Reaktionslage der Protoplasten gegenüber den beiden Wirkungsgruppen der Fusarinsäure wahrscheinlich sehr komplex auswirken. In den welkekranken Pflanzen besteht ja, falls sie von einem Fusarinsäure-bildenden Erreger befallen sind, ein Toxingefälle vom Focus zu den distalen Partien hin: im Bereiche des Focus ist

der Toxinspiegel im idealen Falle hoch; die Schädigung der Wasserpermeabilität der dortigen Protoplasten wird deshalb durch die aliphatische Seitenkette der Fusarinsäure gesteuert; in den peripheren Partien ist dagegen der Toxinspiegel normalerweise niedrig; bei der Schädigung der Wasserpermeabilität ihrer Protoplasten dominiert deshalb der Pyridinring der Fusarinsäure. Ein und dieselbe Verschiebung der Ernährungslage der Protoplasten kann deshalb in den proximalen und in den distalen Partien des Wirtes die Fusarinsäure-Empfindlichkeit der Protoplasten gegensinnig beeinflussen oder sogar auslöschen.

Diese Komplexheit der Voraussetzungen läßt es auch verstehen, daß zwischen dem hier besprochenen Einfluß der unterschiedlichen Stickstoff-, Phosphorsäure- bzw. Kali-Ernährung auf die Fusarinsäure-Empfindlichkeit der Protoplasten und anderseits dem Einfluß dieser unterschiedlichen Ernährung auf die Intensität der visuellen Schädigungssymptome, welche eine bestimmte Dosis Fusarinsäure bei den Versuchspflanzen auslöst, keine unmittelbare Beziehung besteht, ganz abgesehen davon, daß wir noch nicht wissen, wieweit die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten beim Zustandekommen der visuellen Symptome mitwirkt. Wenn z. B. Tomatensprosse mit steigenden Mengen Stickstoff, Phosphorsäure bzw. Kali ernährt werden und hernach eine Fusarinsäuredosis zugeführt erhalten, die in ihrem Zellsaft eine durchschnittliche Fusarinsäurekonzentration von rund 1,0 bis 1,5 · 10^{-3} molar (Wirkungsbereich der aliphatischen Seitenkette!) entstehen läßt, so wird die Intensität der visuell erkennbaren Schädigungen durch steigende Phosphorsäure- bzw. Kaligaben nicht in sichergestellter Weise verschoben, sondern nur durch steigende Stickstoffgaben, wobei aber die Schädigungskurve ein Optimum durchläuft (Abb. 6): die geringste Fusarinsäure-Empfindlichkeit zeigen die stickstoffunter- und die stickstoffüberernährten Exemplare, die höchste Fusarinsäure-Empfindlichkeit dagegen die normal mit Stickstoff ernährten Pflanzen. Wenn alle drei Nährstoffe gleichzeitig in gleichem Sinne variiert werden, so gibt der Stickstoffspiegel den Ausschlag (Zähner, 1955).

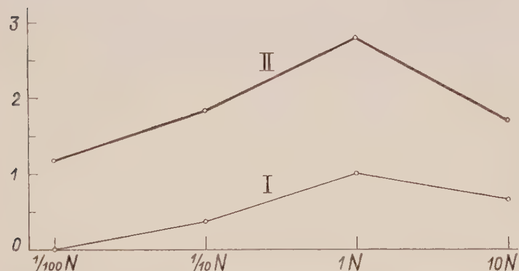


Abb. 6. Der Einfluß steigender Stickstoffgaben auf die Fusarinsäure-Empfindlichkeit der Stengel (Kurve I) und der Blätter (Kurve II) von Tomatensprossen. Abszisse: Stickstoffgehalt der Nährlösung; der Wert 1 N entspricht einer normalen Stickstoffernährung. Ordinate: Intensität der visuell erkennbaren Schädigungen, welche auftreten, wenn im Zellsaft der Versuchssprosse eine durchschnittliche Fusarinsäurekonzentration von etwa 1,0—1,5 · 10^{-3} molar hergestellt wird. Der Schädigungsindex reicht in willkürlichen Einheiten von 0 (keine Schädigung) bis 4 (tödliche Schädigung). (Nach Zähner, 1955)

Noch weniger kann unter diesen Umständen ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen dem Einfluß der unterschiedlichen Stickstoff-, Phosphorsäure- bzw. Kali-Ernährung auf die hier besprochene Schädigung der Wasserpermeabilität der

Protoplasten einerseits und ihrem Einfluß auf die Infektionshäufigkeit und auf die Heftigkeit des Krankheitsverlaufes anderseits (Walker und Foster, 1946; Foster und Walker, 1947; Stoddard und Dimond, 1948) in Frage kommen.

Zusammenfassung

Die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten von *Rhoeo discolor* durch steigende Konzentrationen von Fusarinsäure wird durch eine unterschiedliche Ernährung der Versuchspflanzen mit Stickstoff, Phosphorsäure bzw. Kali stark beeinflußt; doch verändert diese unterschiedliche Ernährung nicht die Empfindlichkeit der *Rhoeo*-Protoplasten für die Fusarinsäuremolekeln als Ganzes, sondern sie verschiebt ihre Reaktionslage gegenüber den beiden Wirkungsgruppen der Fusarinsäuremolekeln, nämlich gegenüber dem Pyridinring und gegenüber der aliphatischen Seitenkette in β-Stellung, in unterschiedlicher Weise.

Die Widerstandsfähigkeit der *Rhoeo*-Protoplasten gegen den Pyridinring der Fusarinsäure, der in niederen Toxinkonzentrationen eine (bei steigender Toxinkonzentration vorübergehende) Übersteigerung ihrer Wasserpermeabilität auslöst, wird bei allen drei Nährstoffen durch eine achtfache Überdosierung erhöht, und zwar um das Zehn- bis Hundertfache. Unterernährung mit einem dieser drei Nährstoffe wirkt dagegen unterschiedlich: die Empfindlichkeit der *Rhoeo*-Protoplasten für den Pyridinring der Fusarinsäure wird durch Kali-Unterernährung (selbst im Ausmaß von $^1/_{64}$ der Normalration) nicht beeinflußt, sondern nur durch Stickstoff- bzw. Phosphorsäuremangel; beide löschen die Empfindlichkeit der *Rhoeo*-Protoplasten für den Pyridinring der Fusarinsäure vollkommen aus, und zwar Stickstoffmangel schon bei der Rate von $^1/_8$, Phosphorsäuremangel dagegen erst bei der Rate von $^1/_{64}$ der Normalration (Abb. 2, Kurve $^1/_8$ N; Abb. 4, Kurve $^1/_{64}$ P). Wegen dieses Ausscheidens des Pyridinringes ist die Fusarinsäure in niederer Konzentration bei den mit Stickstoff bzw. mit Phosphorsäure unterernährten Pflanzen im Sektor „Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten" wirkungslos; ihre toxische Wirkung setzt bei ihnen erst ein, wenn die Konzentrationsschwelle für die schädigende Wirkung der aliphatischen Seitenkette überschritten wird.

Die Reaktionslage der *Rhoeo*-Protoplasten gegenüber der aliphatischen Seitenkette der Fusarinsäure, die in höheren Toxinkonzentrationen die Schädigung der Wasserpermeabilität steuert, wird durch Über- bzw. Unterernährung mit Stickstoff bzw. mit Kali und durch Unterernährung mit Phosphorsäure nicht oder nicht wesentlich beeinflußt, sondern nur durch achtfache Phosphorsäure-Überernährung; diese verkehrt den Wirkungssinn der aliphatischen Seitenkette in sein Gegenteil: sie setzt bei den Phosphorsäure-überernährten *Rhoeo*-Protoplasten die Wasserpermeabilität nicht herab, sondern übersteigert sie (Abb. 3).

Summary

The impairment of the water permeability of *Rhoeo discolor* by increasing concentrations of fusaric acid is greatly influenced by different nourishment with nitrogen, phosphoric acid or potassium. However this different nourishment does not modify the susceptibility of *Rhoeo* protoplasts to the entire fusaric acid molecule, but it changes, in different ways, their reaction to the two effect groups of the fusaric acid molecule, namely the pyridine ring and the aliphatic lateral chain in β-position.

The resistance of *Rhoeo* protoplasts to the pyridine ring of fusaric acid, which, in low concentrations of the toxin, produces a temporary exaggeration of their water permeability, is increased by an eightfold overdose with all three nutritive substances. Undernourishment with one of these three substances, however, produces different effects: the susceptibility of *Rhoeo* protoplasts to the pyridine ring of fusaric acid is not influenced by potassium-undernourishment (even not in the extent of $^{1}/_{64}$ of the normal ration) but only by a lack of nitrogen or of phosphoric acid; both completely extinguish the susceptibility of *Rhoeo* protoplasts to the pyridine ring of fusaric acid, viz. lack of nitrogen at $^{1}/_{8}$, lack of phosphoric acid only at $^{1}/_{64}$ of the normal ration. Owing to this elimination of the pyridine ring, fusaric acid is, in low concentrations, non-toxic for these undernourished plants in the sector „impairment of water permeability of protoplasts"; its toxic effect begins only when the concentration threshold for the injurious effect of the aliphatic lateral chain has been passed.

The reaction of the *Rhoeo* protoplasts to the aliphatic lateral chain of fusaric acid, which, in higher concentrations of the toxin, steers the impairment of the water permeability, is influenced neither by overnourishment or undernourishment with nitrogen or potassium, nor by undernourishment with phosphoric acid. It is influenced only by an eightfold overnourishment with phosphoric acid, which entirely reverses the effect of the aliphatic lateral chain: it does not decrease the water permeability of *Rhoeo* protoplasts overnourished with phosphoric acid, but redoubles it.

Literaturverzeichnis

Bachmann, E., 1956: Der Einfluß von Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität von pflanzlichen Protoplasten. Phytopath. Z. **27**, 255—288.

— —, 1957: Über den Einfluß von Pyridin und Pyridin-Derivaten auf die Wasserpermeabilität von *Spirogyra nitida* und *Rhoeo discolor*. Phytopath. Z. **29**, 177—184.

Foster, R. E., and J. C. Walker, 1947: Predisposition of tomato to *Fusarium* wilt. J. Agr. Res. **74**, 165—185.

Gäumann, E., 1957: Über Fusarinsäure als Welketoxin. Phytopath. Z. **29**, 1—44.

— — und W. Loeffler, 1957: Über die Wirkung von Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität der Markzellen von Tomatenpflanzen. Phytopath. Z. **28**, 319—328.

Stoddard, E. M. and A. E. Dimond, 1948: Influence of nutritional level on the susceptibility of tomatoes to *Fusarium* wilt. Phytopathology **38**, 670—671.

Walker, J. C. and R. E. Foster, 1946: Plant nutrition in relation to disease development. III. *Fusarium* wilt of tomato. Amer. J. Bot. **33**, 259—264.

Zähner, H., 1955: Über den Einfluß der Ernährung auf die Toxinempfindlichkeit von Tomatenpflanzen. Phytopath. Z. **23**, 49—88.

From the Department of Botany, University of Delhi, Delhi 8, India

Investigations on the Nitrogen Metabolism of *Fusarium lycopersici* Sacc.

1. Uptake of Ammonium and Nitrate Nitrogen under Varying Conditions

by

R. S. SANDHU[1]) and B. D. SANWAL

With one figure

A. Introduction

Fungi exhibit a great diversity with respect to their ability to utilize various forms of nitrogen during their growth. On the basis of their nitrogen requirement, ROBBINS (1937, see also STEINBERG, 1939) classified the micro-organisms into four major categories with the presumption that all nitrate utilizing organisms are also capable of assimilating ammonium nitrogen to a varying degree. Since then many fungi have been reported to grow well on nitrate nitrogen but their growth on ammonium nitrogen is either totally inhibited or else depressed to a very great extent (BRIAN et al, 1947; MORTON and MACMILLAN, 1954; APPARAO, 1956). *Fusarium lycopersici* which has been the object of investigations by number of workers (LUZ, 1934; DIMOND and WAGGONER, 1953; SANWAL, 1956) also exhibits a preference for nitrate nitrogen over ammonium nitrogen, although a mixture of the two gives the best growth. This preferential utilization of nitrate nitrogen and the poor ability of ammonium nitrogen to support good growth seems paradoxical because logically, being already reduced, ammonium nitrogen

[1]) Present Address: Department of Special Botany, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich.

should be more suitable for growth than the oxidized form of nitrogen for which a lot of energy has to be expended on its reduction before it is available for amino-acid synthesis.

The most widely held view on the problem has been that all ammonium salts ionize fully at low pH which is a natural consequence of the uptake of cations (NH_4^+) from the culture medium with an ammonium salt as the sole nitrogen source. All weak electrolytes like NH_4OH diffuse inside the cells as whole molecules and not as ions (SMALL, 1929). Ammonium ions therefore do not enter the cells and cessation of growth takes place at low pH.

The addition of certain carboxylic acids in the medium aids the utilization of the otherwise unavailable ammonium nitrogen at low pH. This effect of the organic acids may be explained in terms of their buffering action or their possible participation in the Krebs cycle whereby more keto-acids are produced for amination. This problem still awaits final solution and particularly in the light of recent work on nitrate and ammonia diffusion into fungal cells by MACMILLAN (1956, a, b) and MORTON (1956) a fresh appraisal of the whole problem is needed. The following investigation is an attempt to evaluate the relative roles of ammonia and nitrate as sources of nitrogen in the growth of *Fusarium lycopersici.*

B. Materials and Methods

1. Culture Production

Throughout the course of this work strains R-5-6 and 257 of *Fusarium lycopersici* were used. The fungus was grown in a basal medium of the following composition (SANWAL and SANDHU, 1956):

Dextrose	50 gms	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.069 micro mol.
KNO_3	5 gms	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.015 micro mol.
KH_2PO_4	1 gm	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.004 micro mol.
$MgSO_4$	1 gm	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.004 micro mol.
Fe^{+++}	5 mgs	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.0003 micro mol.
(as ETDA-Iron complex)		$Ni(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$	0.0004 micro mol.
		$NaVO_3 \cdot 2H_2O$	0.0004 micro mol.

Dist. Water 1000 ml

pH adjustments were made with a Beckman pH meter by adding N-KOH solution or N-HCl acid. Twenty five ml. of the medium were dispensed into 250 ml. capacity Erlenmeyer flasks and a standardized drop of uniform spore suspension in distilled water was used as the inoculum for each flask. Cultures were grown at room temperature (varying between 20 °C to 30 °C).

2. Growth Measurement and Analysis

Three replicates were withdrawn every other day after incubation. Growth was determined by mycelial dry weight. The filtrate was made to original volume with distilled water to minimize the errors due to evaporation. Total nitrogen was determined by micro-Kjeldahl digestion using mercury as the catalyst (McKenzie and Wallace, 1954) and potassium sulphate to raise the temperature. After neutralizing the digest with sodium hydroxide and sodium thiosulphate, ammonia was distilled over in a Parnas-Wagner apparatus into boric acid containing methyl red and methyl blue mixed indicator. Excess of nitrate in the filtrate was reduced before digestion by means of dilute sulphuric acid and iron filings.

Ammonium nitrogen of the culture filtrate was determined in an aliquot by making it alkaline to thymolphthalein and distilling the free ammonia into boric acid with the methyl blue-methyl red mixed indicator.

Nitrate nitrogen was determined by a colorimetric method using phenoldisulphonic acid. The yellow colour produced was read in a Spekker absorptiometer with the aid of a blue filter.

Nitrite was determined by the method of Parker (1949).

C. Experimental

1. Effect of $CaCO_3$ Buffer on the Uptake of Nitrate and Ammonia

In order to elucidate the effect of pH on the uptake of NO_3^- and NH_4^+ three series of cultures were grown with initial pH adjusted to 6. Each series had either KNO_3, NH_4NO_3 or $(NH_4)_2SO_4$ as the nitrogen source. The amount of these salts was so adjusted as to furnish 693 mgs. of Nitrogen per litre of the culture medium. In each series half of the flasks received 0.02 % $CaCO_3$ as buffer against the falling pH as growth proceeds on ammonium nitrogen. The relevant data on growth, nitrogen consumption and pH changes are given in Table 1.

The poor growth on $(NH_4)_2SO_4$ in comparison to that on KNO_3 and NH_4NO_3 accompanied by a steep fall in pH is apparent and it also shows the inability of the fungus to check this fall by itself.

In the buffered cultures the growth on $(NH_4)_2SO_4$ is not much less than that on other nitrogen sources showing that low pH in unbuffered cultures is responsible for poor growth, either by its direct effect or by barring the entry of ammonium ions into the fungal cells or both.

A closer study of the log phase of growth in buffered and unbuffered cultures reveals that in the case of $(NH_4)_2SO_4$ series, although growth is normal at constant pH, yet the log phase of growth occured two days later (Fig.). This delay in growth is also accompanied by a delay in ammonia consumption. This in a way is suggestive of a lag phase in which mycelium develops an inner mechanism for ammonia consumption at pH not too

Table 1

Effect of $CaCO_3$ buffer on the uptake of nitrate and ammonia from three different sources of nitrogen

Nitrogen source added.	Days of growth.	pH.	Dry wt. of mycelium mg/ml.	$\overset{-}{NO_3}-N$* mg/ml.	$\overset{-}{NO_2}$ μg/ml.	$\overset{+}{NH_4}-N$ mg/ml.
KNO_3	0	6	—	693	—	—
	4	5.8	1.7	450	5	Trace
	8	7	7.36	152	—	—
KNO_3 + $CaCO_3$	4	6.7	2.44	520	1.2	Trace
	8	7.1	4.46	176	—	—
NH_4NO_3	0	6	—	346.5	—	346.5
	4	4.6	3.7	290	4	252
	8	4.3	14.24	12	—	Trace
NH_4NO_3 + $CaCO_3$	4	6	1.32	?	1.2	286
	8	7	8.72	16	—	3
$(NH_4)_2SO_4$	0	6	—	—	—	693
	4	3	2.36	—	0.08	588
	8	2.4	3.52	—	—	420
$(NH_4)_2SO_4$ + $CaCO_3$	4	6	2.2	—	—	440
	8	6.2	6.62	—	—	25

* N stands for nitrogen.

unfavourable for growth (buffered at about pH 6). At low pH this phenomenon is not seen perhaps due to too unfavourable physiological conditions.

Slight depression in growth rate of the fungus in buffered cultures as compared to unbuffered [excepting in $(NH_4)_2SO_4$ series] may be attributed to the pH effect, growth being optimum at pH 4 to 5.

2. Uptake of Nitrate and Ammonia from various Combinations of Potassium Nitrate and Ammonium Sulphate

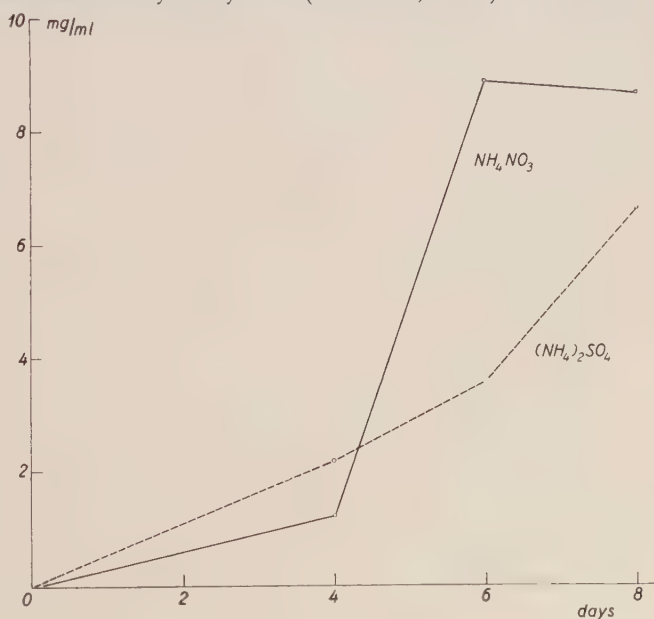
As indicated in the previous experiment, NH_4NO_3 supports better growth than KNO_3. This provided an opportunity to investigate the growth and nitrogen uptake of the fungus from the culture medium containing graded combinations of KNO_3 and $(NH_4)_2SO_4$. Nitrate nitrogen : Ammonium nitrogen ratio varied from 6 : 0 to 0 : 6 with even gradations. In all total

nitrogen per litre of the culture solution remained 693 mgs. The data obtained are given in Table 2.

The addition of ammonia to nitrate cultures brought an improvement of growth up to about 15 % so long as the total quantity of ammonium nitrogen was less than nitrate nitrogen in the culture medium. This fact can be readily explained by assuming that the availability of non-toxic quantities of reduced nitrogen saves extra energy of the fungus which can now be utilized for rapid growth. The addition of small amounts of KNO_3 to $(NH_4)_2SO_4$ also exerts a very beneficial effect resulting in greater amount of growth and increased consumption of ammonium nitrogen which otherwise was checked by low pH. This nitrate effect cannot be explained on simple pH basis: firstly because in 1/5 combination (see Table 2) the fall in pH is the same as in pure $(NH_4)_2SO_4$ and secondly ammonia consumption continues even after the complete exhaustion of nitrate.

A study of Table 2 reveals that nitrate is consumed in almost equal quantities at a pH when ammonium nitrogen is easily accessible to the fungus. This may be due to the easy permeability of nitrate into the cytoplasm, where it serves as an efficient hydrogen acceptor in carbohydrate metabolism thereby providing reduced nitrogen in addition to the already existing ammonia. At the same time an increase in carboxylic acids might occur so as to provide more ammonia acceptors in the biosynthesis of amino-acids.

In certain other fungi like *Scopulariopsis brevicaulis* nitrate consumption is inhibited by ammonia (MORTON and MACMILLAN, 1954). Presence of ammonium salts in the culture medium leads to the blocking of nitrite reduction steps in the nitratase enzyme system (MORTON, 1956). This inhibition of nitratase is not at all apparent in *Fusarium lycopersici* suggesting a different nature of the enzymes. This study is being carried on in detail in our laboratory.



The growth curves on $CaCO_3$ buffered media. (Dry weight of the mycelium per ml. of the culture medium plotted against the days of growth)

Table 2

Growth and uptake of nitrate and ammonium nitrogen from various combinations of KNO_3 and $(NH_4)_2SO_4$ in the culture medium.

Ratio of Nitrate - N/ Ammonia - N	Days of Growth.	pH	Dry wt. of Mycelium mg/ml.	$\overset{-}{NO_3}-N$ mg/ml.	$\overset{+}{NH_4}-N$ mg/ml.
6/0	0	4	—	693	—
	3	5.4	1.32	680	—
	5	7	13.16	—	—
	7	8.3	16.8	—	—
	9	8.8	16.72	—	—
5/1	0	4	—	577.5	115.5
	3	4.3	1.12	?	112
	5	7.3	13.4	—	—
	7	8.2	18.28	—	—
	9	8.6	17.26	—	—
4/2	0	4	—	462	231
	3	4.3	0.76	315	217
	5	7	12.16	1	5
	7	7,6	18.2	—	Trace
	9	7.8	19.2	—	—
3/3	0	4	—	346.5	346.5
	3	4	1.68	280	315
	5	4.6	12.14	20	18
	7	4.4	16.94	—	Trace
	9	3.8	16.98	—	—
2/4	0	4	—	231	462
	3	?	1.42	170	434
	5	3.1	9.5	—	163
	7	2.3	11.1	—	8
	9	2.4	14.34	—	Trace
1/5	0	4	—	115.5	577.5
	3	?	1.22	85	434
	5	2.3	9.26	—	286
	7	2	10.22	—	28
	9	2.1	9.82	—	?
0/6	0	4	—	—	693
	3	?	1.56	—	560
	5	2.3	5.2	—	401
	7	2	4.68	—	378
	9	2.1	4.6	—	273

3. Effect of Carboxylic Acids on the Uptake of Nitrate and Ammonia

Studies of LEONIAN and LILLY (1940), BERNHARD and ALBRECHT (1947), BRIAN et al. (1947) and others have shown the favourable effect of certain organic acids on the uptake of ammonium nitrogen by various fungi. *Fusarium lycopersici* was also investigated in this respect. In one experiment 0.05 M concentrations of oxalic, succinic and citric acids were added to

the basal medium. Addition of acids was preceded by their neutralization with NaOH. Three series with three different sources of nitrogen were set up with each of these acids. Nitrogen sources were KNO_3, NH_4NO_3 and $(NH_4)_2SO_4$. Autoclaving was done after the addition of acids. The data obtained are not presented in detail; the experiment showed that the best growth occured as usual on NH_4NO_3. The addition of carboxylic acids greatly improved growth with $(NH_4)_2SO_4$ as the sole nitrogen source. The lack of any change in growth on the addition of these acids to NH_4NO_3 or KNO_3 rules out their importance as a source of carbon when interpreting their effect on ammonia consumption of the fungus.

In the second experiment, the effect af some other organic acids on the uptake of ammonia from an ammonium sulphate medium was studied. All the acids were added in 0.05 M concentrations as their sodium salts prepared by neutralization with sodium hydroxide prior to autoclaving. Since acetic acid in 0.05 M concentration proved toxic its amount was reduced to 0.01 M. The data obtained are given in Table 3.

Table 3

Effect of certain organic acids on the uptake of ammonium nitrogen from the culture medium containing $(NH_4)_2SO_4$ as the sole nitrogen source

Acid added	Days of growth	pH	Dry wt. of mycelium mg/ml	NH_4^+-N mg/ml
Control	0	4	—	693
	4	2.3	1.9	490
	8	2.1	3.98	313
Acetic	4	2.5	1.86	476
	8	2.2	4.3	266
Pyruvic	4	4.3	0.34	609
	8	2.6	6.5	158
Lactic	4	3.2	4.78	316
	8	2.3	10.46	3.5
Tartaric	4	3.9	6.24	270
	8	8.2	19.2	0.89
Maleic	4	3.8	8.1	127
	8	3.8	20.34	1.5
Malonic	4	3.2	4.96	305
	8	3.3	18.76	2.1
Succinic	4	2.7	4.3	336
	8	2.1	8.78	21
Oxalic	4	5.6	7.72	188
	8	8.4	18.54	2.2
Citric	4	3.2	5.62	266
	8	3.4	16.34	14

Excepting acetate and pyruvate all the acids showed marked improvement in the growth and in some cases an increase of more than 400 % in the growth of the fungus was observed. That acetate is either toxic even in 0.01 M concentration and/or is unsuccessful in checking the fall in pH because of its poor buffering capacity, may be considered as the reasons for the comparatively poor growth in this case; the same explanation may also apply to pyruvic acid.

The best growth recorded is on tartrate, malonate, malate, oxalate (and citrate). This establishes the fact that dicarboxylic acids are superior to others in their influence on the growth and ammonia consumption of *Fusarium*. The changes in pH of the culture medium are more gradual than the control when small amounts of the acids are also present in it. However, in the case of acetate, succinate and lactate pH falls like the control. This suggests that carboxylic ion is active not only through its buffering effect but also through some other mechanism, in mobilizing the ammonium nitrogen for the fungus at low pH.

D. Discussion

Ammonium nitrogen, when it is the only source of nitrogen in a culture medium, gives very poor growth of many fungi as compared to nitrate nitrogen. If the culture solution is well buffered the growth improves and approaches that on nitrate nitrogen. This fact at once suggests that removal of cation from ammonium salts in the unbuffered media lowers the pH which ultimately checks the growth of the organism. This inherent unsuitability of the ammonium salts as a source of nitrogen is accepted without any dissent. The controversy rests on why ammonium nitrogen is not available to the organisms at low pH's when nitrate nitrogen continues to be available and supports growth. Some authors considered that ammonium ions do not penetrate the fungal cells at low pH when ammonium salts completely dissociate because weak electrolytes are thought to penetrate only as whole molecules (SMALL, 1929; BACH and DESBORDES, 1933; ITZEROTT, 1936; BÜNNING, 1936). The evidence enlisted in support of this view is the favourable effect of buffers on the ammonia uptake. For many organisms critical pH has also been worked out, i. e. where the organisms clearly stop taking up ammonium nitrogen (ITZEROTT, 1936; BÜNNING, 1936). This view of the impermeability of the cells to ammonium ion is liable to some objections viz; the ionization of NH_4OH, e. g, is 99.5 % at pH 7 and critical pH should, therefore, lie just near to the neutral point where ionization is likely to be complete. But we find that ammonia consumption is always affected at pH below 3. Secondly, presence of certain substances like organic acids or nitrates renders the ammonium nitrogen available at an otherwise unsuitable pH (LEONIAN and LILLY, 1940; BERNHARD and ALBRECHT, 1947). This is true of the organism under investigation. Thirdly, evidence has been provided in the case of *Scopulariopsis brevicaulis* and other fungi which establishes the fact that ammonia shows passive permeability into

the fungal cells at a fairly wide range of pH (MacMillan, 1956 a). The above facts bring us to a situation where the concept of the impermeability of ammonium ion as the cause of inhibited nitrogen assimilation at low pH stands invalidated and an explanation has to be sought elsewhere.

The toxicity of ammonia for living matter depends on its concentration; certain minimum concentrations are always tolerable but beyond these limits toxicity ensues and retards metabolic activity. In higher plants the rate of penetration of ammonium ions is always less than their rate of incorporation into amino acids and hence a toxic stage is never reached. But in fungi and other micro-organisms, in which the whole body of the organism is in contact with the culture medium, the rate of penetration of ammonia is quicker and it is only at maximum metabolic activity that the ammonia in the cells is as rapidly incorporated into the amino acid structure. Thus the whole metabolic machine is protected by reason of its high activity. This concept if applied to the data in hand works well. Ammonium ions penetrate into the fungal cells by simple osmotic mechanism and their inner concentration depends on how fast they are taken up by the ammonia acceptors (keto acids combining with ammonia through reductive amination and trans-amination etc). In other words the higher the metabolic activity the lesser the chances of ammonia accumulating in toxic concentrations and vice versa. Since metabolic activity depends on pH the ammonia effect will as well. pH optimum for growth must also be optimum for ammonia uptake and on either side of this pH ammonia must retard metabolism and nitrogen assimilation. This fact is clearly indicated in the data given in the paper. When NH_4NO_3 is the sole source of nitrogen the pH does not fall, because anions and cations are consumed simultaneously and the reaction of the culture medium does not hinder the growth of the fungus. But in ammonium sulphate cultures the acidity increases as the consumption of ammonium ions proceeds. This brings the metabolic activity to such a low level that ammonium ions accumulate in the cytoplasm, become toxic and aggravate the condition further. Similarly at pH higher than 4 the growth rate falls and so the metabolic activity does, with the result that ammonia has the chance to accumulate and become toxic. But here the pH factor is not so acute and therefore the metabolic activity does not succumb to the ammonium toxicity as it occurs at low pH. The toxicity in $CaCO_3$ buffered cultures, however, is reflected in the delay of the log phase from the 4th to the 6th day of the growth of *Fusarium* (fig.).

When small amounts of nitrate are present along with ammonium nitrogen in the culture medium the uptake of ammonia is increased to a considerable extent (Table 2). The simultaneous consumption of nitrate and ammonium ions in the very early stages of growth keeps the balance in the reaction of the medium. This initially gained metabolic momentum continues to produce ammonia acceptors and after some time much ammonia would be consumed before very high acidity brings about growth inhibition.

The simultaneous consumption of nitrate and ammonia suggests that nitrate because of its easy penetration into the fungal cells and H-accepting

capacity is automatically taken up. It is reduced and assimilated further by a metabolic set up inspite of the presence and consumption of the already reduced form of nitrogen (NH_4^+). The nitrate may be viewed as the nearest hydrogen acceptor in the fungal metabolism, hence its simultaneous consumption with ammonia.

From all this it may be concluded that ammonium ions, even at low pH, penetrate the fungal cells as usual. In the absence of an adequate rate of ammonia acceptor production they accumulate and exert toxic effects Nitrate ion consumption on the other hand can still take place because its accumulation in the cytoplasm is not toxic and moreover its removal from the medium by the organism reduces the hydrogen ion concentration. This explanation will also suit the findings of many other authors like ITZEROTT (1936) who have reported that fungi consume only nitrate when pH of the culture medium goes below 3. The beneficial effect of certain organic acids on ammonia consumption (LEONIAN and LILLY, 1940; BERNHARD and ALBRECHT, 1947; BURKHOLDER and McVEIGH, 1940) as also reported in this paper is due to their buffering capacity and also to their participation in the TCA cycle and consequent production of more ammonia acceptors.

That nitrate and ammonia are consumed simultaneously at favourable pH's for growth is quite opposite to the findings of MORTON and McMILLAN (1954) where in the case of *Scopulariopsis brevicaulis* ammonium ion inhibits nitrate reduction and its uptake (see also MORTON, 1956). The nitratase of *Fusarium lycopersici* is certainly of a different nature from that of *Scopulariopsis brevicaulis;* this however, needs to be established in detail.

Summary

1. *Fusarium lycopersici* grew well with protassium or ammonium nitrate as the sole nitrogen source; with ammonium sulphate growth in unbuffered cultures was poor and was accompanied by a sharp fall in pH to below 3.
2. In calcium carbonate buffered cultures growth improved on ammonium sulphate although the log phase of growth was delayed by two days (fig.).
3. The addition of certain organic acids in 0.05 M concentraion increased growth and ammonia consumption to considerable extent. Not all the acids were effective in checking the fall in the pH of the culture medium.
4. Small amounts of nitrate when added to the medium containing ammonium sulphate as the sole nitrogen source improved growth and ammonia consumption although the fall in pH followed the same pattern as the control.
5. The inhibited growth on ammonium sulphate has been considered as the effect of an accumulation of ammonium ions in

toxic concentration in the fungal cells. The view that ammonium ions cannot enter the living cells has been rejected on the basis of the data given.

6. Since the nitrate utilization was not affected by the presence of ammonium salts in the culture medium the nitratase system of *Fusarium lycopersici* is considered to be different from that of *Scopulariopsis brevicaulis* where ammonia inhibits nitrate reduction.

Zusammenfassung

1. Auf Nährlösungen mit Kalium- oder Ammoniumnitrat als Stickstoffquelle gedeiht *Fusarium lycopersici* gut. Verwendet man hingegen Ammoniumsulfat, so ist das Wachstum gering; dabei sinkt das pH stark bis unter 3.
2. Durch Puffern der Ammoniumsulfat-Nährlösung mit Calciumcarbonat kann das Wachstum verbessert werden. Verglichen mit dem Verhalten auf Kalium- oder Ammoniumnitrat-Nährlösung tritt jedoch der logarithmische Anstieg der Wachstumskurve (Abb.) zwei Tage später ein.
3. Auch organische Säuren (0,05 molar) fördern das Wachstum und die Ammonium-Aufnahme; hingegen vermögen nicht alle Säuren das Absinken des pH in der Kulturlösung zu verhindern.
4. Werden kleine Mengen Nitrat zur Ammoniumsulfat-Nährlösung zugegeben, so verbessert sich wohl das Wachstum und die Ammonium-Aufnahme, das pH sinkt jedoch in gleicher Weise wie bei der Kontrolle.
5. Die hemmende Wirkung des Ammoniumsulfats wird darauf zurückgeführt, daß sich in der Pilzzelle die Ammonium-Ionen bis zu toxischen Konzentrationen anhäufen. Nach den in der Diskussion gemachten Angaben ist es unwahrscheinlich, daß Ammonium-Ionen nicht in die lebende Zelle eintreten können.
6. Im Gegensatz zu *Scopulariopsis brevicaulis* verwertet *Fusarium lycopersici* Nitrate, auch wenn sich Ammoniumsalze in der Kulturlösung befinden. Die Nitratase-Systeme der beiden Pilze scheinen verschieden zu wirken.

We thank Prof. P. Maheshwari, Head of the Botany Department of Delhi University, for extending to us all the necessary laboratory facilities and permitting one of us (R. S. S.) to work in the Botany laboratories.

Literature cited

Apparao, A., 1956: The role of pH in nitrogen utilization of *Piricularia oryzae*. Experientia 12, 215.

Bach, D. and D. Desbordes, 1933: Action paradoxale du mycelium *d'Aspergillus repens* sur le nitrate d'ammoniaque. Enrichissement du milieu en ammoniaque. C. R. Acad. Sc. Paris 197, 1772—1774.

Bernhard, K. und A. Albrecht, 1947: Stoffwechselprodukte des Mikroorganismus *Phycomyces Blakesleeanus* in glukosehaltiger Nährlösung und Untersuchungen über das Wachstum dieses Schimmelpilzes bei verschiedenen Stickstoffquellen. Helv. chim. acta **30**, 627—632.

Brian, P. W., P. J. Curtis and H. G. Hemming, 1947: Glutinosin: a fungistatic metabolic product of the mould *Metarrhizium glutinosum*. Proc. Roy. Soc., B, **135**, 106—132.

Bünning, E., 1936: Über die Farbstoff- und Nitrataufnahme bei *Aspergillus niger*. Flora **131**, 87—112.

Burkholder, P. R. and I. Mc Veigh, 1940: Growth of *Phycomyces Blakesleeanus* in relation to varied environmental conditions. Amer. J. Bot. **27**, 634—640.

Dimond, A. E. and P. E. Waggoner, 1953: On the Physiology of Lycomarasmin production. Phytopathology **43**, 619—623.

Itzerott, D., 1936: Über die Bedingungen der Stickstoffaufnahme, vor allem der Nitrataufnahme, bei *Aspergillus niger*. Flora **131**, 60—86.

Leonian, V. G. and L. H. Lilly, 1940: Studies on the nutrition of fungi. IV. Factors influencing the growth of some thiamin-requiring fungi. Amer. J. Bot. **27**, 18—26.

Luz, G., 1934: Über den Stoffwechsel von *Fusarium lycopersici* und *Fusarium lini*. Phytopath. Z. **7**, 585—638.

MacMillan, A., 1956 a: The entry of Ammonia into fungal cells. J. Exp. Bot. **7**, 113—126.

— —, 1956 b: The entry of Nitrate into fungal cells. Physiol. Plantarum **9**, 470—481.

McKenzie, H. A. and H. S. Wallace, 1954: The Kjeldahl determination of nitrogen: A critical study of digestion conditions; temperature, catalyst and oxidizing agents. Aust. J. Chem. **7**, 55—70.

Morton, A. G., 1956: A study of nitrate reduction in mould fungi. J. Exp. Bot. **7**, 97—112.

— — and A. MacMillan, 1954: The assimilation of nitrogen from ammonium salts and nitrate by fungi. J. Exp. Bot. **5**, 232—252.

Parker, C. A. 1949: The reaction of nitrous acid with alcoholic alpha-napthylamine hydrochloride and its application to the absorptiometric determination of nitrites. Analyst **74**, 112—118.

Robbins, W. J., 1937: The assimilation by plants of various forms of nitrogen. Amer. J. Bot. **24**, 243—250.

Sanwal, B. D., 1956: Investigations on the metabolism of *Fusarium lycopersici* Sacc. with the aid of radio- active carbon. Phytopath. Z. **25**, 333—384.

— —, and R. S. Sandhu, 1956: Utilization of iron from ethylenediamine tetraacetic acid-iron chelate complex in culture medium by *Fusarium*. Experientia **12**, 380.

Small, J., 1929: Hydrogen-ion concentration in plant cells and tissues. Protoplasma-Monographien **2**, Berlin.

Steinberg, R. A., 1939: Growth of fungi on synthetic nutrient solutions. Bot Rev. **5**, 327—350.

Istituto di Patologia Vegetale della Università, Catania, Italia
Direttore: Prof. A. Ciccarone

Alcune ricerche intorno alla attività fitotossica dei liquidi colturali di *Deuterophoma tracheiphila* Petri - I [1])

Di

ANTONIO GRANITI

Introduzione

Deuterophoma tracheiphila Petri, deuteromicete sferossidale, è, come è noto, l'agente patogeno di una delle più importanti malattie degli agrumi in Italia e nel bacino mediterraneo: il „mal secco".

A questa tracheomicosi (almeno in prove di inoculazione artificiale) sono apparse suscettibili praticamente tutte le specie di agrumi (RUGGIERI, 1948; RUGGIERI e GOIDANICH, 1953); mentre in campo, alle infezioni naturali sono particolarmente sensibili, tra le specie coltivate di maggiore importanza economica, il limone [*Citrus Limon* (L.) Burm.] e l'arancio amaro (*Citrus Aurantium* L.).

I sintomi del „mal secco" sono ben noti e consistono in: clorosi e necrosi delle foglie e dei giovani rami; filloptosi; colorazioni anormali (color salmone, aranciato o bruno) del legno; disseccamento dei rami e, infine, di tutta la

1) Queste ricerche furono condotte presso l'Istituto di Botanica speciale della Scuola Politecnica Federale di Zurigo (Svizzera), diretto dal Prof. E. GÄUMANN, durante il periodo in cui chi scrive usufruì di una borsa di perfezionamento negli studi, concessagli dal Ministero della Pubblica Istruzione italiano.

Lo scrivente esprime la propria riconoscenza al Prof. E. GÄUMANN per la cordiale ospitalità offertagli nel proprio Istituto e a tutti coloro che gli furono prodighi di consigli e di aiuto, in particolare al Dr. H. KERN, che lo iniziò a questi studi e sotto la cui guida condusse le ricerche. Ringrazia anche sentitamente il Prof. A. CICCARONE, Direttore dell' Istituto di Patologia vegetale della Università di Catania (Italia), per l'incoraggiamento, i consigli e le discussioni con lui avute sugli argomenti trattati nel presente lavoro e per aver rivisto il manoscritto di questa nota.

pianta. Poco invece si sa circa il modo con il quale questi caratteristici sintomi vengono indotti e quali siano i probabili meccanismi d'azione del fungo nell'interno della pianta.

Nella bibliografia esistono solo alcune ricerche intorno a questo ultimo aspetto del problema e più precisamente circa la presenza, nei liquidi di coltura „in vitro" del patogeno, di sostanze capaci di indurre, su foglie e germogli recisi di limone, di arancio amaro o di altri vegetali (pomodoro, in particolare), alcuni sintomi (avvizzimento, necrosi fogliari, filloptosi, imbrunimento delle nervature fogliari).

Tali ricerche farebbero però pensare che, anche nella patogenesi della tracheomicosi degli agrumi, potrebbero avere importanza prodotti metabolici del patogeno ad azione fitotossica („tossine" nel senso di DIMOND e WAGGONER, 1953; forse „tossine di avvizzimento" di GÄUMANN, 1951). Ad essi pertanto, una volta che, isolati e chimicamente definiti, ne fossero accertate anche la presenza e l'azione nei tessuti delle piante naturalmente infette (che siano cioè „vivotossine" sensu DIMOND e WAGGONER, 1953), potrebbe essere attribuita, almeno in parte, la sindrome della malattia.

L'importanza dei prodotti del metabolismo di *D. tracheiphila* nel meccanismo d'azione del patogeno „in vivo" era già stata supposta da PETRI fino dai suoi primi studi sul fungo: „Il micelio non è dotato di una così elevata virulenza da poter uccidere direttamente ed invadere il cambio ed i tessuti corticali. Essi muoiono solo per effetto dei prodotti del metabolismo del fungo. Esso agisce un pò come i *Verticillium* nel caso delle *tracheomicosi* da essi prodotte. Riducendo i nitrati in nitriti, formando indolo a spese delle sostanze proteiche, esso svolge un'azione tossica sopra il cambio e i tessuti della corteccia." (PETRI, 1930, p. 147.)

Tuttavia, poiché BERTOSSI e CAPOZZI (1951) negarono una azione inibitrice dei filtrati colturali di *D. tracheiphila* (alle concentrazioni da 10^{-2} a 10^{-7}) sulla proliferazione di organi vegetali „in vitro", il primo riconoscimento della presenza di metaboliti fitotossici nei liquidi colturali del fungo si è avuto solo con un lavoro di ORSHANSKAYA (1952).

Ella difatti, in esperienze condotte nel 1950 e 1951 in Russia, dimostrò che filtrati freschi di coltura di *D. tracheiphila* erano capaci di determinare avvizzimento delle foglie di giovani germogli di pomodoro, di limone e di *Cyperus*. Inoltre, estratti eterei di colonie del fungo su riso o di feltri micelici freschi su substrati liquidi risultavano tossici verso piante di *Cissus antarctica* Vent.

Più recentemente, POLYAKOV e SHUMAKOVA (1954), sempre in Russia, studiarono l'influenza di alcune condizioni (temperatura, valore del pH) del substrato sull'accumulo di prodotti fitotossici nei liquidi colturali di *D. tracheiphila*. Essi conclusero che tali sostanze sarebbero più facilmente prodotte, a valori di pH compresi tra 5,0 e 6,8, tra i 21 °C e i 24 °C di temperatura e che il valore iniziale del pH (da 4 a 7,8) dei liquidi nutritivi avrebbe influenza sull'accrescimento del fungo e sulla attività fitotossica dei filtrati solo nel primo periodo di sviluppo delle colonie.

Nello stesso anno, in Italia, SCRIVANI (1954) condusse una serie di ricerche orientative sui metaboliti tossici presenti nei liquidi colturali di *D. tracheiphila*, pervenendo a conclusioni, alcune delle quali qui si riassumono:

1. i due pigmenti prodotti dal fungo („razza R" di *D. tracheiphila;* cfr. BALDACCI, 1950) in coltura e identificati da QUILICO, CARDANI, PIOZZI e SCRIVANI (1952) come derivati antrachinonici non sembrerebbero avere attività fitotossica, essendo fra l'altro insolubili in acqua;
2. la formazione di metaboliti fitotossici nei liquidi colturali di *D. tracheiphila* sarebbe incrementata quando ad un liquido nutritivo di CZAPEK, contenente il 2 % di glucosio come sorgente idrocarbonata, viene aggiunto estratto di mais in proporzione del 9 %. Di per se stesso, questo substrato, sterilizzato in autoclave, non seminato e non diluito, avrebbe una debole attività fitotossica verso germogli recisi di pomodoro e di limone;
3. i filtrati colturali del fungo, allevato per 20—35 giorni su tale substrato (anche se diluiti in rapporto di 1 : 7, al massimo), risulterebbero tossici verso germogli recisi di pomodoro e di limone immersi in essi per 24 ore;
4. le frazioni fitotossiche dei filtrati colturali sarebbero solubili in alcool etilico[1]) e probabilmente insolubili in etere etilico; esse sarebbero alquanto termostabili, ma si inattiverebbero se conservate a lungo, anche a basse temperature (+ 2 ° — + 5 °C);
5. la defecazione del filtrato grezzo con acetato basico di piombo ne esalterebbe l'azione fitotossica (la quale, peraltro, non verrebbe diminuita dalla ultrafiltrazione), mentre toglierebbe completamente la debole attività fitotossica al substrato nutritivo sterile.

I sintomi rilevati da SCRIVANI consistevano nell'appassimento e nella presenza di macchie necrotiche sulle lamine fogliari di piantine recise di pomodoro e nell'avvizzimento, necrosi delle lamine fogliari, imbrunimento della nervatura principale delle foglie e filloptosi nei germogli recisi di limone.

Le ricerche, di cui in questa nota si espongono alcuni risultati, hanno avuto lo scopo di approfondire per quanto possibile — dato il limitato spazio di tempo di cui si disponeva — la conoscenza intorno alle sostanze ad azione fitotossica elaborate „in vitro" da *D. tracheiphila*, con particolare riferimento ai seguenti argomenti:

1. azione dei liquidi di coltura del fungo sui vegetali superiori (piante recise di pomodoro, in particolare);
2. condizioni di formazione dei composti fitotossici nei liquidi di coltura di *D. tracheiphila*;
3. natura dei composti ad azione fitotossica elaborati dal patogeno „in vitro".

Poiché un'unica trattazione diverrebbe necessariamente complessa, si è creduto opportuno render conto separatamente degli argomenti studiati. In

[1]) Nelle esperienze di SCRIVANI, al filtrato colturale previamente concentrato sotto vuoto a $^1/_{10}$ del volume iniziale veniva aggiunto alcool etilico al 70 %. Non è tuttavia specificata la concentrazione alcoolica del miscuglio risultante.

In tali condizioni, la solubilità in alcool etilico delle sostanze ad azione fitotossica presenti nei filtrati colturali non può però essere affermata. Si può invece dire che tali sostanze non sono precipitate dall'alcool diluito. Esse difatti, come sembrerebbero dimostrare esperienze condotte dallo scrivente, sarebbero in effetti insolubili in alcool etilico assoluto e rimarrebbero dunque disciolte nella frazione acquosa dei miscugli alcool-acqua.

questa nota, pertanto, si riferisce principalmente intorno a quelli oggetto del punto 1. In successivi contributi, la cui pubblicazione seguirà in questa stessa Rivista, si esporranno poi i risultati delle ricerche di cui ai punti 2. e 3. e si discuteranno complessivamente gli esperimenti condotti e le conclusioni ragiunte.

I. Condizioni e metodi delle esperienze

A) Tecnica colturale

In tutte le esperienze di cui in seguito si impiegò un ceppo monoconidico di *Deuterophoma tracheiphila* Petri, isolato nel marzo 1956 ad Acireale (Catania) da picnidi differenziatisi in natura su rami di arancio amaro (*Citrus Aurantium* L. *cult.*) e contrassegnato dalla sigla: DPR/108.

Questo ceppo, coltivato su substrati glucosati e agarizzati, presenterebbe i caratteri della „razza DPR" di BALDACCI (1950); ha cioè micelio dapprima ialino, poi bruno ed è capace di produrre pigmento rosso-aranciato e numerosi picnidi sui substrati solidi. La produzione di picnidi è andata però attenuandosi con i successivi trasferimenti delle colonie su substrati artificiali.

La sua patogenicità fu accertata inoculando frammenti di colonie del fungo nel fusto di giovani piante di arancio amaro. In seguito alle inoculazioni, si riprodussero i caratteristici sintomi con i quali il „mal secco" si presenta in natura. Dai vasi legnosi di vari organi delle piante così artificialmente infettate fu poi possibile reisolare il fungo, le cui carratteristiche in coltura risultarono identiche a quelle del ceppo inoculato.

Quando non altrimenti indicato nel testo di questa nota, la tecnica colturale seguita nelle varie esperienze fu la seguente.

Il fungo era normalmente allevato su agar-malto, in tubi e in matracci conici da cc 500. Questi ultimi, che contenevano cc 100 di substrato e nei quali si lasciavano sviluppare le colonie per 3—4 settimane, servirono per preparare l'inoculo per i substrati liquidi.

Da ogni matraccio si ottennero cc 50 di inoculo, consistente in una sospensione di conidi e frammenti di micelio in acqua distillata sterile. Ogni matraccio contenente substrato liquido venne seminato, a mezzo di pipette sterili, con cc 1 di tale sospensione.

Per le colture su substrati liquidi furono impiegati matracci conici di vetro neutro da cc 500, alti circa cm 20 e con un diametro basale di circa cm 9,5. Poiché in ciascun matraccio vennero versati cc 100 di substrato, l'altezza dello strato liquido risultò in media di circa mm 15.

Il liquido nutritivo fu preparato con i costituenti e nelle proporzioni indicate da SCRIVANI (l. c., p. 98):

KCl	g	0,50
K_2HPO_4	g	1,00
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	g	0,50
$NaNO_3$	g	2,00
$Fe''(SO_4) \cdot 7\,H_2O$	g	0,01
Glucosio	g	20,00
Estratto di mais (corn steep liquor)	g	90,00
Acqua distillata fino a	cc	1000,00

ma con una tecnica di preparazione forse un pò diversa. Non si sa se la concentrazione idrogenionica del liquido colturale impiegato in queste esperienze corrispondeva a quella usata da SCRIVANI e se il contenuto in sostanza secca dell'estratto di mais era lo stesso. Si usò difatti un estratto concentrato di mais contenente circa il 60 % di sostanza secca[1]); esso venne tuttavia impiegato nella proporzione di g 90 per ogni litro di substrato, poiché da esso fu separato l'abbondante precipitato formatosi quando il valore del pH dell'estratto (disciolto in metà dell'acqua occorrente per il substrato) fu portato da circa pH 3,9 a pH 5—6 con l'aggiunta di soluzioni di KOH. Quando questo precipitato non venne separato, la sua presenza nel liquido nutritivo non sembrò avere sensibile influenza sullo sviluppo delle colonie di *D. tracheiphila,* né sulla attività fitotossica dei filtrati colturali del fungo. Ad analoga conclusione erano già pervenuti MOYER e COGHILL (1946) nei riguardi di *P. notatum* e della formazione di penicilline.

Dopo l'aggiunta del filtrato limpido alla soluzione degli altri costituenti del liquido nutritivo, il valore del pH venne controllato e opportunamente aggiustato (per lo più, da pH 5 a pH 5,5).

A causa della presenza di amminoacidi e di altri prodotti di degradazione proteica, nonché di fosfati e di lattati nell'estratto di mais, questo substrato risulta molto „tamponato"; sono difatti necessarie sensibili quantità di correttori per spostarne il valore del pH: cc 100 di una soluzione al 10 % di estratto di mais avrebbero richiesto cc 161 di NaOH normale per portare il pH da 4 a 8,5 (MOYER e COGHILL, 1946, p. 70).

Il substrato così preparato venne suddiviso nei matracci e sterilizzato in autoclave per 20 minuti a 115 °C. Dopo la sterilizzazione, si depositava talvolta sul fondo dei matracci un precipitato bruno. Esso non venne tuttavia separato, poiché la sua esclusione dalle colture (*D. tracheiphila* venne coltivata, per prova, nel liquido limpido decantato in matracci sterili) non sembrò avere apprezzabile influenza sullo sviluppo delle colonie nè sulla attività fitotossica dei liquidi colturali del fungo.

Nella maggior parte dei casi, le colture (colture stazionarie) vennero mantenute, all'oscuro, in una camera termostatica a 21 ° ± 1 °C.

Dopo che le colonie si erano completamente sviluppate (normalmente, dopo 25—33 giorni dalla semina), il liquido di ogni matraccio venne raccolto per filtrazione attraverso filtri tarati di carta. Del micelio, lavato con cc 200 di acqua calda (60—70 °C) e successivamente essicato assieme al filtro per una notte a 60 °C e per 4 ore a 103 °C, si determinò poi il peso, che di solito venne espresso come media di tre valori. Il peso netto del micelio secco fu ottenuto per differenza tra il peso del micelio + filtro e quello del residuo della filtrazione del liquido nutritivo testimone non seminato + filtro, determinati dopo l'essiccazione.

[1]) In alcuni liquidi nutritivi impiegati per l'allevamento di *Penicillium notatum* Westl. (cfr. ad es.: MOYER e COGHILL, 1946 e 1946 a), l'estratto di mais („concentrated corn steep liquor") viene aggiunto in proporzione del 9 % se esso contiene il 55 % di sostanza secca. Se ne contiene più o meno, la quantità da impiegare dovrebbe essere calcolata sulla base della sostanza secca (circa g 50 per litro di substrato).

Le porzioni di filtrato colturale destinate ai saggi di fitotossicità furono centrifugate per mezz'ora a circa 3000 giri al minuto. Se non immediatamente utilizzati, i filtrati colturali, il cui pH veniva portato a 4—4,5 con l'aggiunta di HCl diluito, erano conservati in una camera refrigerata a —1 ^{0} ± 1 ^{0} C. Se però il periodo di conservazione era lungo, prima di essere acidificati e refrigerati essi venivano concentrati in strato sottile e a pressione ridotta a circa $^1/_{10}$ del loro volume.

B) Misura della fitotossicità

In alcune prove preliminari, di cui si riferirà in seguito, non fu possibile accertare con sicurezza una qualche azione antibiotica di *D. tracheiphila* verso microrganismi diversi (furono saggiate al proposito alcune specie di batteri, di lieviti e di ifomiceti).

Più favorevoli risultati si ottennero invece quando si sottoposero all'azione dei liquidi colturali del fungo, o a frazioni di essi, alcuni vegetali superiori (arancio amaro, pomodoro).

D'altra parte, poichè nei saggi di fitotossicità le piantine o i germogli recisi di arancio amaro reagivano assai lentamente e si dimostravano poco sensibili, si finì per impiegare quasi esclusivamente piante di pomodoro (*Lycopersicum esculentum* Mill.) della cultivar „Tuckswood".

Per essi saggi, fu adottata la tecnica descritta e seguita da GÄUMANN e Collaboratori (si vedano, ad esempio: GÄUMANN, NAEF-ROTH e MIESCHER, 1950; GÄUMANN, NAEF-ROTH e REUSSER, 1950; LINSKENS, 1955).

Le giovani piante di pomodoro destinate ai saggi venivano recise al di sopra della quinta foglia spiegata a partire dall'apice (la porzione asportata aveva così 4 foglie, di cui la inferiore corrispondeva normalmente alla terza foglia adulta differenziata dalla pianta) ed immediatamente immerse in acqua.

Nei saggi „qualitativi" le piante recise erano collocate a gruppi di tre in tubetti contenenti il liquido da saggiare, in modo che la porzione inferiore del fusto pescasse nel liquido (le piante testimoni erano poste, nelle stesse condizioni, in acqua di fonte) e vi rimanevano per un periodo di tempo prefissato (6—12 ore), per essere infine trasferite per 30 ore in acqua. Dopo tale periodo si procedeva alla valutazione dei sintomi.

Nei saggi „quantitativi" le piantine venivano invece poste singolarmente nei tubetti. Dopo che esse avevano assorbito la quantità di liquido prefissata e calcolata in base al loro peso (ad esempio: cc 0,25 di liquido per ogni grammo di peso della pianta fresca), venivano trasferite in acqua per 24 ore. I sintomi erano valutati alla fine di questo periodo.

Le piante testimoni erano lasciate, nelle medesime condizioni, in acqua distillata finchè tutte le piante dei saggi avessero assorbito la dose di liquido loro assegnata. La valutazione dei sintomi era fatta stimando a vista quelli suscettibili di espressione numerica (per lo più: necrosi fogliari; allessamento

e imbrunimento vascolare del fusto), secondo le due seguenti scale empiriche di valori da O a 4:

Sintomi fogliari

0 = assenza di sintomi
1 = sintomi estesi fino al 10 %, della superficie fogliare
2 = sintomi fino al 40 %
3 = sintomi fino al 60—65 %
4 = sintomi fino all'80 % ed oltre

Sintomi sul fusto[1])

0 = nessun sintomo
1 = sintomi presenti nel quarto inferiore del fusto
2 = sintomi estesi a metà della lunghezza del fusto
3 = sintomi estesi a $^{3}/_{4}$ della lunghezza del fusto
4 = sintomi presenti anche nel quarto apicale del fusto

Ad occhio si riuscirono tuttavia a valutare anche valori intermedi fra le unità delle scale.

I sintomi fogliari erano separatamente rilevati per ognuna delle 4 foglie presenti sul germoglio. Di essi, fu poi calcolata la media. Il risultato finale di ogni prova era poi dato dalla media delle intensità dei sintomi presenti su ogni fusto e, per le foglie, da quella che si otteneva mettendo insieme le medie già ottenute per le singole piante, nel modo sopra indicato.

Altri eventuali sintomi (avvizzimento; flaccidità delle lamine; imbrunimento delle ramificazioni vascolari delle foglie) di difficile o impossibile valutazione numerica, furono oggetto di semplice descrizione.

II. Azione dei filtrati colturali di *D. tracheiphila* sulle piante recise di pomodoro

A) Prove orientative sui filtrati colturali

Per orientarsi sulla attività fitotossica dei liquidi colturali di *D. tracheiphila*, si condussero alcune prove preliminari nelle quali si saggiò qualitativamente l'azione di tali liquidi, filtrati e centrifugati, su piantine recise di pomodoro „Tuckswood".

A queste ultime vennero fatti assorbire, durante sei ore, filtrati colturali grezzi (provenienti da colture di varia età, allevate a differenti temperature) diluiti con acqua in rapporto volumetrico di 1 : 4 (una parte di filtrato e 4 parti di acqua distillata).

Le piante testimoni furono poste, nelle stesse condizioni, in acqua distillata.

I sintomi vennero rilevati dopo 30 ore dal trasferimento delle piante in acqua di fonte.

A titolo di esempio, si riportano nella tabella 1 i risultati di una di tali prove.

---

[1]) Quando si ritenne opportuno, si precisò, in millimetri, l'estensione media dell'allessamento basale del fusto.

Tabella 1

Temperatura di allevamento delle colture	Età delle colture, giorni	Peso medio del micelio secco per cc 100 di substrato g	Valore del pH del filtrato non diluito*)	Valore medio della intensità dei sintomi	
				Foglie	Fusto
21° C	15	0,482	5,70	0,37	1,5
	20	1,138	6,20	0,41	2,0
	30	1,301	7,80	0,54	2,0
27° C	12	0,304	5,50	0,23	1,0
	20	1,185	6,10	0,25	1,0
	30	1,284	7,05	0,45	1,5
Piante testimoni				0,00	0,0

*) Valore iniziale del pH del substrato nutritivo = 5,40.

In questi saggi preliminari, si notò che sulle piante sottoposte all'azione dei filtrati colturali diluiti si manifestavano ben presto sintomi di appassimento[1]).

Dopo il trasferimento in acqua, le piantine riacquistavano in gran parte il turgore, ma sulle foglie erano comparse necrosi marginali e internervali. La maggior parte dei lobi delle fogliole rimaneva inoltre arrotolata verso l'alto.

I fasci xilematici del fusto e talora le ultime ramificazioni vascolari delle foglie si presentavano poi per vasti tratti imbruniti. I fusti delle piantine che più evidentemente mostravano tale sintomo furono sezionati a mano libera. In corrispondenza degli imbrunimenti, i lumi dei vasi xilematici apparvero occlusi da sostanze giallo-brune di aspetto gommoso.

In alcuni casi era infine evidente anche un limitato allessamento della parte basale dello stelo.

Piante recise di pomodoro, lasciate per 48 ore nei filtrati diluiti 1 : 4, avvizzirono completamente e non riacquistarono il turgore dopo il loro trasferimento in acqua. Dopo tale periodo, le loro lamine erano anzi quasi interamente disseccate ed i piccioli e il fusto in gran parte allessati.

Sulle piante testimoni non apparve alcun sintomo.

Queste prove preliminari portarono alle conclusioni provvisorie che seguono:

1. i filtrati colturali ottenuti da colonie del ceppo DPR/108 di *D. tracheiphila* su substrato liquido di Scrivani, diluiti con acqua in proporzione

[1]) Con i termini „appassimento" e „avvizzimento", si è inteso indicare stati patologici di crescente intensità (completamente reversibile il primo; irreversibile il secondo), la cui espressione è una progressiva perdita del turgore e una apparente disidrosi della pianta, manifestantesi soprattutto con: 1. arrotolamento dei margini e flaccidità dei tessuti (specialmente internervali) delle lamine fogliari; 2. diminuzione della rigidità e deturgescenza di tutta la foglia, dei piccioli e della porzione apicale del fusto, con conseguente effetto sul portamento degli organi (foglie reclinate; piante prostrate); 3. aspetto idropico e consistenza molle di porzioni del fusto o dei piccioli (allessamento).
A tali sintomi seguono, di regola, processi necrotici locali e disseccamenti.

di 1 : 4, erano capaci di indurre alcuni sintomi su piante recise di pomodoro, dopo che queste li avevano assorbiti per 6 ore.

I sintomi osservati comprendevano fenomeni di appassimento, necrosi fogliari, allessamento della base del fusto e imbrunimento dei fasci legnosi.

Con periodi di assorbimento più lunghi (48 ore), le piante avvizzivano completamente;

2. l'attività dei filtrati, per quanto riguardava i sintomi fogliari (appassimento delle foglie; aree necrotiche sulle lamine) e l'imbrunimento dei fasci legnosi del fusto, andava apparentemente aumentando con l'età delle colture, almeno fino a 30 giorni di età delle stesse; essa attività sembrava cioè dipendere anche dall'età delle colonie e dall'elevarsi del valore del pH dei liquidi colturali. L'allessamento della base del fusto sembrò invece manifestarsi più intensamente con i filtrati prelevati dalle colture più giovani;

3. delle due temperature saggiate (21 ^{0} e 27 ^{0} C), quella più favorevole allo sviluppo del fungo e ad una maggiore tossicità dei liquidi colturali era la minore.

B) Influenza della diluizione sulla attività fitotossica dei filtrati colturali

In successive prove, in cui si volle osservare l'influenza della concentrazione dei filtrati colturali sulla loro attività fitotossica, si utilizzarono colture di 30 giorni di età, allevate a 21 ^{0} C.

I liquidi di ogni matraccio, separatamente filtrati e riportati al volume originario del substrato (cc 100) con acqua distillata, furono riuniti assieme. Il pH del miscuglio così ottenuto risultò: 6,4.

Il peso medio del micelio secco di ogni matraccio (riferito cioè a cc 100 di substrato) fu valutato g 1,246.

Nelle prove i cui risultati sono esposti nella tabella 2, porzioni del liquido colturale aggiustato nel modo anzi detto furono variamente diluite con acqua distillata e comparativamente saggiate su pomodoro, in due differenti dosi, in saggi quantitativi. Il pH delle diverse diluizioni variò da pH 6,2 a pH 6,4.

Per ogni tesi si saggiarono 5 piante. I testimoni furono lasciati in acqua finchè tutte le piante avessero assorbito i liquidi in prova.

Già dopo 1—2 ore dalla immersione nei liquidi colturali, le piante manifestavano sintomi di appassimento, tanto più gravi quanto meno diluito era il filtrato colturale. Essi sintomi si andavano poi aggravando con il permanere delle piante nelle soluzioni.

Dopo 10—12 ore dall'inizio della esperienza, gran parte delle piante non aveva ancora completamente assorbito la dose di liquido loro fornita. Dopo 20—22 ore, i liquidi dei tubetti in cui permanevano le piante non ancora trasferite in acqua erano fortemente inquinati da microrganismi, in particolare da batteri. Ciò nonostante, la prova fu protratta finchè tutte le piante avessero utilizzato la quantità di liquido loro assegnata.

I risultati dei saggi portarono alle seguenti conclusioni:

1. nelle condizioni delle esperienze, la dose di cc 0,5 per grammo di peso delle piante era assorbita in tutti i casi in un numero di ore eccessivo per permettere una buona sorveglianza dei saggi e per evitare forti inquinamenti microbici;

2. la dose di cc 0,25/g portava a risultati soddisfacenti con i filtrati diluiti in proporzione di 1 : 1 e 1 : 4;

3. per ottenere risultati attendibili da prove analoghe, si dovevano escludere quanto più possibile le contaminazioni microbiche dei liquidi in saggio.

C) Influenza della variazione della concentrazione idrogenionica sulla attività fitotossica dei filtrati colturali

In alcuni saggi, il filtrato colturale usato nella precedente prova fu diluito con acqua distillata in proporzione di 1 : 1 e di 1 : 4 e fu impiegato alla unica dose di cc 0,25/g.

I saggi furono condotti in due serie parallele: la prima con i filtrati diluiti, la cui concentrazione idrogenionica non venne modificata (pH 6,2); la seconda con i filtrati diluiti nello stesso modo, ma acidificati fino a pH 4,2 mediante aggiunta di soluzioni 6N di HCl.

In seguito alla acidificazione, si formò un precipitato bruno che non venne separato.

Le piante testimoni furono immerse, per il periodo massimo di assorbimento dei liquidi in saggio, in acqua distillata acidulata con HCl rispettivamente fino a pH 4,2 e 6,2.

Per ogni tesi furono saggiate 5 piante. Nella tabella 3 sono riassunti i risultati ottenuti.

Nel corso della prova si notò che, specialmente dopo le prime ore, le piante assorbivano i liquidi a pH 4,2 più rapidamente di quelli a pH 6,2. Inoltre, quelle poste nei filtrati meno acidi manifestavano sintomi di appassimento più presto e con maggiore evidenza delle altre.

Le piante immerse nel filtrato a pH 6,2 diluito 1 : 1 non riuscirono ad assorbire completamente la dose di liquido loro destinata che in un numero di ore assai elevato (23 ore) ed erano quasi completamente avvizzite prima del loro trasferimento in acqua.

Al termine della prova, nei liquidi acidificati non erano macroscopicamente evidenti contaminazioni microbiche. Gli altri liquidi risultarono invece fortemente inquinati.

In altre prove, infine, si portò la concentrazione idrogenionica dello stesso filtrato colturale agli estremi limiti (pH 4; pH 8) consentiti dal metodo di saggio adottato.

A due porzioni del filtrato furono aggiunte soluzioni 6 N di HCl e di KOH fino a spostare il valore del pH (che era di 6,4), rispettivamente fino a pH 4 e a pH 8. Il pH di una terza porzione del medesimo filtrato fu portata dapprima a 8 e poi a 4.

Anche in questo caso, in seguito alla acidificazione si depositava sul fondo dei recipienti un precipitato bruno.

I precipitati vennero separati per centrifugazione ed i liquidi limpidi, diluiti in proporzione di 1 : 4, furono saggiati quantitativamente su pomodoro.

Le piante testimoni furono immerse, per il periodo massimo di assorbimento dei liquidi in prova, in soluzioni diluite di HCl e di KOH, aventi rispettivamente pH 4 e pH 8.

Tabella 2

Diluizione*)	Dose **)	Tempo medio di assorbimento (ore)	Sintomi osservati dopo il trasferimento delle piante in acqua per 24 ore	Valore medio della intensità dei sintomi	
				Foglie	Fusto
1 : 1	0,25	12	Foglie: avvizzimento moderato; necrosi centripete sulle lamine. Fusto: allessamento basale; imbrunimento fasci legnosi.	0,62	2
	0,50	30	Foglie: flaccidità dei tessuti internervali delle fogliole; necrosi centripete assai estese sulle lamine; piccioli reclinati. Fusto: allessamento basale; imbrunimento fasci legnosi.	3,22	3
1 : 4	0,25	10	Foglie: accartocciamento verso l'alto dei margini delle lamine; leggero avvizzimento; qualche necrosi marginale. Fusto: limitato imbrunimento fasci legnosi.	0,49	1
	0,50	22	Foglie: accartocciamento e avvizzimento più intensi che nel caso precedente. Necrosi marginali ed internervali sulle lamine. Fusto: allessamento basale; imbrunimento fasci legnosi.	0,69	2
1 : 9	0,25	4	Foglie: accartocciamento verso l'alto e necrosi dei lobi delle fogliole. Fusto: limitato imbrunimento fasci legnosi.	0,20	1
	0,50	20	Foglie: sintomi come il precedente, aggravati da necrosi internervali sulle lamine. Fusto: imbrunimento fasci legnosi.	0,44	2
0 : 1 (testimone)		30	Nessun sintomo.	0,00	0

*) Espressa come rapporto tra volumi di filtrato colturale grezzo e di acqua distillata.

**) Espressa come volume (in cc) di liquido per ogni grammo di peso delle piante fresche.

I liquidi acidificati furono assorbiti dalle piante più velocemente (4^h 30′) di quelli alcalinizzati (6^h 40′). I primi indussero maggior quantità di sintomi fogliari (necrosi marginali e internervali) e più modesti effetti di avvizzimento dei secondi.

L'imbrunimento dei fasci vascolari del fusto si manifestò più intensamente con i liquidi alcalini e fu minimo con i liquidi acidificati dopo alcalinizzazione.

Dalle prove, di cui per brevità si omette di riportare i dati numerici, sembrò di poter concludere quanto segue:

1) aggiungendo acidi (HCl diluito) al filtrato colturale, precipitavano sostanze brune che si depositavano sul fondo dei recipienti. Il precipitato rimaneva in gran parte insolubile in acqua distillata o acidulata e non induceva alcun sintomo sulle piante;

Tabella 3

Diluizione	pH dei liquidi in saggio	Dose	Tempo medio di assorbimento	Sintomi osservati dopo il trasferimento delle piante in acqua per 24 ore	Valore medio della intensità dei sintomi	
					Foglie	Fusto
1 : 1	4,2	0,25	7^h 50′	Foglie: lieve avvizzimento; arrotolamento verso l'alto dei lobi e degli apici delle fogliole. Necrosi marginali e internervali sulle lamine. Fusto: imbrunimento dei fasci legnosi.	0,75	0,65
	6,2	0,25	23^h 00′	Foglie: flaccidità delle lamine; avvizzimento dei margini. Necrosi centripete su le lamine. Fusto: allessamento basale e imbrunimento fasci legnosi.	2,65	1,80
1 : 4	4,2	0,25	4^h 45′	Foglie: arrotolamento verso l'alto dei lobi e degli apici delle fogliole. Necrosi marginali e internervali sulle lamine. Fusto: imbrunimento fasci legnosi.	0,70	0,60
	6,2	0,25	6^h 00′	Foglie: Lieve avvizzimento; arrotolamento verso l'alto dei margini delle lamine. Necrosi marginali sulle fogliole; rare le internervali. Fusto: imbrunimento fasci legnosi.	0,50	1,00
0 : 1 (testimoni)	4,2	—	23^h 00′	Nessun sintomo.	0,00	0,00
	6,2	—	23^h 00′	Nessun sintomo.	0,00	0,00

2) con l'acidificazione dei filtrati colturali (fino a pH 4—4,2) si evitavano forti contaminazioni microbiche dei liquidi durante i saggi di fitotossicità;

3) il tempo di assorbimento era tanto più breve quanto più basso era il valore del pH dei liquidi in prova;

4) sulle piante che avevano assorbito liquidi acidificati, in confronto a quelli delle altre serie, alcuni sintomi (necrosi fogliari; arrotolamento dei margini delle fogliole) si manifestavano più nettamente e con maggiore frequenza; altri invece (sintomi di appassimento e di avvizzimento; imbrunimento dei fasci vascolari), con minore intensità. L'intensità dei sintomi parve poi dipendere direttamente dal grado di acidità o alcalinità dei liquidi in prova;

5) l'avvizzimento sembrava connesso alla presenza di occlusioni gommose nei vasi xilematici. Abbassando il pH dei filtrati, le occlusioni si presentavano in quantità minore.

Già dalle semplici prove di cui si è reso conto, si ebbe l'impressione che i fenomeni di disidrosi (appassimento, avvizzimento) indotti dai filtrati colturali di *D. tracheiphila* sulle piante di pomodoro, avessero molteplice origine e potessero essere almeno in parte attribuiti:

a) all'azione — prevalentemente fisica — di composti a grosse molecole presenti nei filtrati (composti già presenti nel substrato od elaborati dal fungo), che influirebbero sul bilancio idrico delle piante;

b) all'azione — enzimatica o necrotica — dei filtrati colturali sulle cellule della pianta e conseguente gommosi vascolare.

Queste azioni, rendendo difficile la salita dei liquidi e la loro penetrazione nelle cellule, ridurrebbero anche l'espressione dei sintomi fogliari indotti forse da metaboliti tossici del fungo. Difatti, precipitando ed idrolizzando parzialmente il filtrato, non solo aumenta la velocità dell'assorbimento, ma l'intensità di tali sintomi (necrosi sulle lamine) diviene maggiore.

D) Effetto delle alte temperature sulla attività fitotossica dei filtrati colturali

Nel corso delle ricerche si aveva spesso necessità di sottoporre i filtrati colturali di *D. tracheiphila* a temperature relativamente alte (per aumentare la loro concentrazione, ad esempio). Parve pertanto utile conoscere se nei filtrati sottoposti a riscaldamento variasse l'attività fitotossica.

Una porzione di cc 100 di un liquido colturale filtrato, ottenuto da colture di 34 giorni di età ed avente un pH di 8,1, fu fatto bollire per 10′ in un distillatore. Il distillato fu raccolto a parte. Dopo raffreddamento, il pH del liquido bollito risultò: 7,2; quello del distillato: 9,3.

Un'altra porzione dello stesso filtrato fu mantenuta per 10′ a 60 °C in un bagnomaria. Dopo raffreddamento, il pH del liquido così trattato risultò: 7,9.

I tre liquidi vennero acidificati con HCl fino a raggiungere pH 4,5 e successivamente centrifugati.

Con essi (il distillato non fu diluito; gli altri liquidi furono diluiti con acqua in rapporto di 1 : 4) vennero effettuati saggi qualitativi. Servì per confronto il filtrato colturale non trattato, diluito in proporzione di 1 : 4, il cui pH fu aggiustato a due diversi valori (pH 4,5; pH 8).

Le piante nel filtrato non trattato e le altre in quello che era stato riscaldato a 60 °C manifestarono una sindrome analoga a quella descritta nei precedenti paragrafi. Il filtrato bollito indusse solo sintomi fogliari (arrotolamento dei margini e qualche limitata necrosi dei lobi). Il distillato indusse estese necrosi marginali sulle foglie e avvizzimento di qualche picciolo, mentre non causò alcun danno apparente al fusto.

Si concluse: 1) il riscaldamento a 60 °C (almeno per una durata di 10') dei filtrati colturali non ne riduceva sensibilmente la fitotossicità; 2) l'ebollizione alterava profondamente i liquidi colturali (dopo l'ebollizione, essi avevano odore di corno bruciato) e li privava quasi completamente di attività fitotossica; 3) i prodotti volatili che passavano nel distillato (probabilmente prodotti di degradazione proteica, poichè anche il distillato aveva il caratteristico odore sopra ricordato) risultarono assai tossici per le piante.

E) Effetto della conservazione a bassa temperatura sulla attività fitotossica dei filtrati colturali

Si è già detto che i liquidi impiegati per i saggi di fitotossicità venivano talora conservati per qualche tempo in camere refrigerate.

In via orientativa, si volle conoscere se l'attività fitotossica dei filtrati colturali venisse modificata dalla permanenza dei liquidi a basse temperature (intorno a — 1 °C).

Risultò che nei filtrati colturali grezzi, provenienti da colture di 20—30 giorni di età, dopo alcuni giorni si sviluppavano colonie microbiche (per lo più, batteri), visibili anche macroscopicamente. Se i liquidi venivano acidificati prima della conservazione, gli inquinamenti (che in questo caso erano causati da funghi) si manifestavano più tardi (dopo alcune settimane) e in minor misura.

In ambo i casi, l'attività fitotossica dei liquidi così conservati, rispetto a quella dei liquidi freschi, risultò modificata in modo assai vario, probabilmente in relazione alla qualità e alla quantità dei contaminanti e alla durata della conservazione.

Si notò tuttavia che in genere i filtrati conservati, rispetto a quelli freschi, inducevano sulle piante recise di pomodoro alcuni sintomi (necrosi fogliari) in minor quantità ed altri (allessamento basale del fusto) con intensità maggiore.

Si pensò allora di conservare sterilmente colture integre del fungo.

Si trasferirono, senza aprirli, alcuni matracci contenenti colonie di 32 giorni in una camera mantenuta a temperatura di circa — 1 °C.

Dopo 4 mesi, i matracci vennero aperti e il loro contenuto filtrato per carta. Il peso del micelio secco risultò di circa la metà inferiore a quello delle colonie non conservate. Il valore del pH del liquido colturale risultò maggiore.

I liquidi colturali così conservati indussero sulle piante recise di pomodoro più numerosi sintomi fogliari, più intenso allessamento del fusto e minor imbrunimento vascolare dei liquidi colturali freschi[1]).

Si concluse così che non era possibile conservare per lungo tempo a bassa temperatura i filtrati colturali tal quali, senza pregiudicarne l'attività fitotossica. Talora, furono però conservati per qualche giorno (4—5 giorni, al massimo), nelle condizioni di temperatura anzidette, filtrati colturali acidificati (valore del pH intorno a 4) che non potevano essere immediatamente utilizzati per i saggi di fitotossicità.

F) Effetto della concentrazione dei filtrati sulla loro attività fitotossica

Per periodi più lunghi di conservazione (da 4—5 giorni a 4—5 mesi), i filtrati colturali vennero concentrati fino a $^1/_{10}$ (talora, fino a $^1/_2$) del loro volume e successivamente acidificati, prima della refrigerazione.

Dopo alcune prove orientative, l'effetto della concentrazione dei liquidi colturali sulla loro attività fitotossica venne studiato su due diversi filtrati. Il primo di essi, contrassegnato con il N. o 82, fu ottenuto da un substrato aggiustato inizialmente a pH 4,5, su cui *D. tracheiphila* era cresciuta per 30 giorni a 21 °C. Il peso medio del micelio secco per cc 100 di liquido nutritivo risultò = g 1,639; il valore del pH = 6,70. Il secondo, contrassegnato con il N. o 57, proveniva da colture allevate per 28 giorni a 21 °C e inizialmente aggiustate a pH 4,3. Il peso medio del micelio secco per cc 100 di substrato fu calcolato = g 1,292; il valore del pH = 5,32.

Dei due filtrati, si prelevò una porzione di cinque litri e ad ognuna di esse si aggiunse cc 1 di un prodotto antischiuma a base di siliconi (Dow Corning Antifoam A Emulsion).

I liquidi vennero poi separatamente concentrati in strato sottile e a pressione ridotta, fino a circa $^1/_{10}$ del loro volume, in un apparecchio concentratore Luwa.

Dopo refrigerazione per una notte, i concentrati così preparati furono filtrati per carta. Il filtrato 57 lasciò sul filtro uno scarsissimo residuo, mentre dal filtrato 82 si separò un precipitato relativamente abbondante.

Piccole porzioni di questi filtrati concentrati vennero riportate ai volumi originari con acqua distillata. I valori del pH risultarono così modificati: filtrato N. o 57, pH 5,25; filtrato N. o 82, pH 6,18.

1) I risultati di una prova (diluizione dei filtrati = 1 : 4; pH dei liquidi diluiti = 4,2; dose = cc 0,25/g) furono ad esempio i seguenti: Intensità media dei sintomi sulle foglie con filtrati freschi = 0,72; con filtrati conservati = 1,33. Sul fusto: imbrunimento vascolare, rispettivamente = 0,50 e 0,30; allessamento basale, rispettivamente = tracce e 1,6.

La concentrazione aveva dunque determinato un abbassamento del pH, più sensibile nel filtrato 82 (nel quale si era formato abbondante precipitato) che nell'altro.

In saggi quantitativi, i filtrati concentrati e successivamente riportati al volume originario vennero messi a confronto: 1) con i filtrati grezzi non concentrati, cui venne unito lo 0,02 % del prodotto antischiuma sopra ricordato; 2) con il precipitato separato dal concentrato N. o 82, lavato per tre volte con acqua acidulata a pH 4 e disciolto (in parte, sospeso) in acqua distillata neutra; 3) con una soluzione allo 0,02 % del prodotto antischiuma in acqua distillata.

Per brevità, i risultati dei saggi non sono riportati in tabella. Dalle prove, sembrò di poter concludere:

1) nelle condizioni delle esperienze, la concentrazione di filtrati colturali a reazione acida non diminuì sensibilmente la loro attività fitotossica;

2) la concentrazione di filtrati colturali prossimi alla neutralità o alcalini ebbe per effetto una precipitazione di sostanze di per se stesse non tossiche, ma la cui presenza nei liquidi colturali influiva notevolmente sul risultato dei saggi di fitotossicità. Queste sostanze difatti, forse per occlusione meccanica dei vasi legnosi, aumentavano il tempo di assorbimento e causavano l'appassimento delle piante, limitando sensibilmente nello stesso tempo la comparsa di alcuni gravi sintomi fogliari (necrosi sulle lamine).

Azione del substrato nutritivo sterile sulle piante recise di pomodoro

Poiché nelle esperienze in oggetto, *D. tracheiphila* era stata allevata su un substrato a composizione chimica complessa e necessariamente indefinibile (dipendendo dal tipo di estratto di mais usato), si ritenne essenziale conoscere l'effetto del liquido nutritivo sterilizzato e non seminato e dei suoi componenti sulle piante recise di pomodoro.

Nelle medesime condizioni (rapporto di diluizione: 1 : 4 e, talora, anche 1 : 1; valore del pH dei liquidi diluiti: 4,1; dose: cc 0,25/g) furono confrontati, in saggi quantitativi, i seguenti liquidi:

a) liquido colturale di colonie di *D. tracheiphila* di 30 giorni di età, allevate a 21 °C;

b) liquido nutritivo, sterilizzato e tenuto nelle stesse condizioni;

c) soluzione di estratto di mais al 9 % in acqua distillata, filtrata a pH 5 e sterilizzata;

d) soluzione di glucosio al 2 %, sterilizzata;

e) soluzione dei sali minerali (nelle proporzioni impiegate per la preparazione del substrato), sterilizzata.

Tutti i liquidi vennero filtrati per carta e centrifugati dopo l'aggiustamento del pH a 4,1.

Le conclusioni dei saggi furono le seguenti:

Nelle condizioni delle esperienze, il liquido colturale di *D. tracheiphila*, filtrato, acidificato e diluito, induceva sulle piante recise di pomodoro una sindrome consistente in:

1. sintomi di avvizzimento (foglie pendule; flaccidità dei tessuti internervali delle lamine; arrotolamento verso l'alto dei margini delle fogliole) relativamente gravi a diluizione di 1 : 1, meno gravi a diluizione di 1 : 4;

2. necrosi del margine o di aree internervali delle lamine fogliari, più gravi nelle concentrazioni maggiori del filtrato;

3. gommosi ed imbrunimento dei fasci legnosi del fusto, più intensi ed estesi a diluizione di 1 : 1; lievi e poco estesi a diluizione di 1 : 4;

4. allessamento basale del fusto, relativamente modesto a diluizioni di 1 : 1; lievissimo a diluizioni di 1 : 4.

Il substrato nutritivo non seminato, nelle stesse condizioni, induceva:

1. sintomi di avvizimento (appassimento delle foglie; arrotolamento verso l'alto dei lobi delle fogliole) meno gravi e complessi di quelli causati dal filtrato colturale alle stesse concentrazioni;

2. necrosi dei margini delle lamine fogliari, a diluizione di 1 : 1; necrosi limitate agli apici dei lobi, a diluizioni di 1 : 4; le aree necrotiche internervali erano rare o assenti;

3. imbrunimento dei fasci legnosi del fusto di tenue tonalità cromatica; gommosi vascolare rara o assente;

4. allessamento basale del fusto, relativamente grave a diluizione di 1 : 1; modesto, a diluizione di 1 : 4.

Sempre nelle stesse condizioni, l'estratto di mais al 9 % causava una sindrome analoga a quella del substrato nutritivo completo, almeno alla unica diluizione saggiata (1 : 4).

Nessun sintomo era causato dagli altri componenti del substrato nutritivo (glucosio e sali minerali).

Risultò evidente dunque che anche il substrato nutritivo sterile era capace di indurre alcuni sintomi e che, in esso, il componente attivo era l'estratto di mais. Nei saggi condotti nel corso delle ricerche oggetto della presenta nota (effettuati con diluizioni di 1 : 4 e con dosi di cc 0,25/g), i liquidi nutritivi sterilizzati e non seminati causarono sintomi fogliari la cui intensità variò entro limiti espressi da indici di intensità compresi tra 0,07 e 0,24.

Tuttavia i sintomi causati dal filtrato colturale, talora differenti o con diversa localizzazione (necrosi internervali delle lamine fogliari), erano in genere più complessi e, ad eccezione dell'allessamento basale del fusto, più intensi.

Pertanto, nelle ricerche che seguirono e particolarmente nelle prove di frazionamento chimico, i liquidi nutritivi sterili furono sempre messi in

confronto ai liquidi colturali del fungo, onde tener conto dell'azione dei composti già presenti nel substrato sulle piante dei saggi.

Riassunto

1. Si espongono i risultati di ricerche intorno alla attività fitotossica dei liquidi colturali di *Deuterophoma tracheiphila* Petri, agente patogeno del „mal secco" degli agrumi. Il fungo fu allevato a 21 °C per 20—25 giorni su liquido nutritivo di SCRIVANI (1954), contenente il 9 % di estratto di mais.

2. I filtrati colturali indussero sulle piante: a) fenomeni di disidrosi e deturgescenza, varianti dall'appassimento all'avvizzimento, nei casi più gravi complicantisi con disseccamenti delle foglie e allessamenti di gran parte del fusto e dei piccioli; b) necrosi marginali e internervali sulle lamine fogliari; c) gommosi e imbrunimento degli elementi xilematici del fusto e delle nervature capillari delle lamine fogliari; d) limitato allessamento della porzione basale del fusto.

3. L'abbassamento del pH o la concentrazione dei filtrati colturali ebbero per effetto la formazione di un precipitato bruno. Quando esso fu separato, i liquidi indussero sulle piante avvizzimento e gommosi vascolare più lievi, ma maggior quantità di necrosi fogliari.

4. L'ebollizione dei filtrati colturali per 10 minuti alterò profondamente i liquidi; il loro riscaldamento a 60 °C per 10 minuti non ne ridusse sensibilmente l'attività fitotossica.

5. Per la conservazione dei filtrati colturali, si ricorse alla concentrazione fino a $^1/_{10}$ del loro volume e alla loro successiva acidificazione. L'attività fitotossica dei concentrati così conservati risultò lievemente diminuita rispetto a quella dei filtrati freschi.

6. Il liquido nutritivo di SCRIVANI, sterilizzato e non seminato, indusse sintomi analoghi a quelli causati dal liquido colturale in cui era cresciuto il fungo. Essi furono però meno intensi e talora diversi. In particolare, le necrosi internervali sulle lamine, l'imbrunimento e la gommosi dello xilema si manifestarono con minore evidenza, mentre gli effetti di avvizzimento furono più modesti. Il componente attivo del liquido nutritivo non seminato era l'estratto di mais.

Zusammenfassung

1. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Toxinbildung von *Deuterophoma tracheiphila* Petri, dem Erreger der „mal secco"-Welkekrankheit der Agrumen, in vitro. Die Zucht des Pilzes erfolgte auf der Nährlösung von SCRIVANI (mit 9 % Maisextrakt) bei 21 °C während 20—35 Tagen; zur

Prüfung der Giftwirkung der Kulturfiltrate wurden abgeschnittene Tomatensprosse als Testobjekt verwendet.

2. Die Kulturfiltrate verursachten an den Pflanzen a) ein mehr oder weniger starkes Erschlaffen oder Verdorren der Blattspreiten, Blattstiele und Stengel; b) Nekrosen an den Rändern und in den Interkostalfeldern der Blattspreiten; c) Bräunungen des Xylems in Stengel und Blattnerven; d) Erschlaffen der Stengelbasis.

3. Ansäuerung oder Konzentrierung der Kulturfiltrate führten zur Bildung eines braunen Niederschlags. Die von diesem Niederschlag befreiten Kulturfiltrate verursachten geringere Erschlaffung und Gefäßverstopfung, jedoch stärkere Blattnekrosen.

4. Die Kulturfiltrate ließen sich ohne Aktivitätsverlust während 10 Minuten auf 60, nicht aber auf 100 °C erwärmen.

5. Die auf rund ein Zehntel ihres Volumens konzentrierten und angesäuerten Kulturfiltrate ließen sich ohne wesentlichen Aktivitätsverlust während längerer Zeit aufbewahren.

6. Die sterilisierte und nicht beimpfte Nährlösung verursachte ähnliche Symptome wie die Kulturfiltrate; die Blattnekrosen, die allgemeine Erschlaffung und die Gefäßbräunungen waren jedoch wesentlich schwächer. Die Giftwirkung der Nährlösung beruht auf dem Maisextrakt; über die Versuche zur Isolierung der vom Pilz gebildeten Toxine soll später berichtet werden.

Bibliografia

Baldacci, E., 1950: Caratteri colturali delle razze di *Bakerophoma tracheiphila*. Not. Mal. Piante **9**, 27—32.

Bertossi, F., e A. Capozzi, 1951: A proposito dell'azione del filtrato di *Bakerophoma tracheiphila* (Petri) Cif. su coltura di tessuti vegetali in vitro. Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. **27**, 601—602.

Dimond, A. E., and P. E. Waggoner, 1953: On the nature and role of vivotoxins in plant disease. Phytopathology **43**, 229—235.

Gäumann, E., 1951: Some problems of pathological wilting in plants. Adv. Enzymology **11**, 401—437.

— —, S. Naef-Roth und G. Miescher, 1950: Untersuchungen über das Lycomarasmin. Phytopath. Z. **16**, 257—288.

— —, — — und P. Reusser, 1950: Über die Inaktivierung von Lycomarasmin durch Strepogenin. Phytopath. Z. **17**, 229—232.

Linskens, H. F., 1955: Der Einfluß der toxigenen Welke auf die Blattausscheidungen der Tomatenpflanze. Phytopath. Z. **23**, 89—106.

Moyer, A. J., and R. D. Coghill, 1946: Penicillin. VIII. Production of penicillin in surface cultures. J. Bact. **51**, 57—78.

— —, and — —, 1946 a: Penicillin. IX. The laboratory scale production of penicillin in submerged culture by *Penicillium notatum* Westling (NRRL 832). J. Bact. **51**, 79—93.

Orshanskaya, V. N., 1952: Some results of a study of cultures of the fungus *Deuterophoma tracheiphila* Petri and some aspects of their application to the control of wilt disease of *Citrus* — „mal secco". U. S. S. R. Acad. Sci. News (= Bull. Acad. Sci. U. S. S. R.) **1,** 89—100; cit. sec. Rev. Appl. Mycol. **31,** 604—605, 1952.

Petri, L., 1930: La riproduzione sperimentale del mal secco dei limoni. Rend. Acc. Naz. Lincei **11,** ser. 6, 146—149.

Polyakov, I. M., and A. A. Shumakova, 1954: Toxin accumulation during the development of the fungus *Deuterophoma tracheiphila* Petri under different growing conditions. Rep. (= Proc.) Lenin Acad. agric. Sci. **19,** 43—48; cit. sec. Rev. Appl. Mycol. **33,** 600—601, 1954.

Quilico, A., C. Cardani, F. Piozzi e P. Scrivani, 1952: I pigmenti del *Deuterophoma tracheiphila.* Rend. Acc. Naz. Lincei **12,** ser. 8, 650—657.

Ruggieri, G., 1948: Fattori che condizionano o contribuiscono allo sviluppo del „mal secco" degli agrumi e metodi di lotta contro il medesimo. Ann. Sperim. Agr., n. s., **2,** 255—305.

— —, e G. Goidanich, 1953: Il „Mal secco" degli Agrumi. Giorn. di Agric. **1953,** No. 3.

Scrivani, P., 1954: Patogenesi, riproduzione sperimentale del mal secco da *Deuterophoma tracheiphila* Petri e ricerche sulla formazione di metaboliti tossici in coltura. Phytopath. Z. **22,** 83—108.

Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für gärtnerische Virusforschung, Berlin-Dahlem

Thermale Inaktivierung von zwei Pflanzenviren

Ein Beitrag zur Wärmetherapie pflanzlicher Viruskrankheiten[1])

Von

B. WEIL

Mit 12 Abbildungen

A. Einleitung

Die Natur der Erreger der pflanzlichen Viruskrankheiten ist bis zum heutigen Tage nur ungenügend bekannt. Dies lassen schon die Bemühungen verschiedener Forscher wie HOLMES (20), JOHNSON und HOGGAN (29), BENNET (7), SMITH (63) u. a. um die Einordnung der Viren in ein System erkennen, wobei sowohl das Verhalten der Viren selbst gegen biologische, physikalische, chemische und physikalisch-chemische Untersuchungsmethoden wie auch die Reaktionen der Hauptwirtspflanzen auf den Virusbefall zugrunde gelegt werden. RYSHKOW (60) versucht, in seiner Systematik der Viren auch die möglichen ontogenetischen Zustände bei der Klassifizierung zu verwenden. In keinem Falle reichen die bisher vorliegenden Einsichten und Erkennt-

[1]) Die vorliegende Arbeit wurde als Dissertation an dem o. a. Institut angefertigt. Ich darf dem Präsidenten der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Herrn Prof. Dr. H. RICHTER, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes sowie Herrn Prof. Dr. H. MÜLLER für die stete Hilfsbereitschaft meinen besten Dank aussprechen. Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. H. A. USCHDRAWEIT als Leiter des Instituts, der mich mit vielfachen Ratschlägen unterstützt hat, und Herrn E. SCHÄLOW für die Anfertigung der Abbildungen.

nisse zu einer befriedigenden Ordnung und Einstufung der Viren in die Entwicklungsgeschichte der Lebewesen aus.

Die Unzulänglichkeit der bisherigen Erkenntnisse macht sich auch bemerkbar, wenn es sich um die Klärung des Krankheitsgeschehens bei pflanzlichen Viruskrankheiten handelt. So kann auf die Frage nach dem biologischen Ablauf der Erkrankung von der Infektion bis zur Manifestierung bisher keine klare Antwort gegeben werden. Man definiert die Viren als obligat intrazelluläre Körper mit gewissen parasitischen Eigenschaften, die mit der lebenden Substanz der Zelle sehr eng verbunden sind. Daher scheint es kaum möglich, eine viruskranke Pflanze zu heilen, ohne die Zellen selbst zu schädigen oder abzutöten; eine Bekämpfung durch therapeutisch wirkende Mittel mit dem Ziel der unmittelbaren Vernichtung der Erreger wird also immer auf große Schwierigkeiten stoßen. Dies ist von besonderer Bedeutung für die vegetativ zu vermehrenden Kulturpflanzen.

Um hier zu verhindern, daß sich Infektionsherde in einem Bestand ausbreiten und der Nachbau erkrankt, müssen deshalb indirekte Bekämpfungsverfahren — z. B. laufende Ausscheidung erkrankter Pflanzen, Verhütung der Vektorvermehrung usw. — angewendet werden. Solche Sanierungsmaßnahmen gehören in landwirtschaftlichen Vermehrungsbetrieben — z. B. bei der Bekämpfung der Viruskrankheiten der Kartoffel — bereits zu den regelmäßig durchgeführten Arbeiten; sie sind auch im Erwerbsgartenbau die bisher einzigen wirksamen Mittel, um gesunde Pflanzen für die Vermehrung durch Ausläufer, Rhizome, Knollen, Zwiebeln, Stecklinge u. a. zu erhalten.

1. Allgemeine Bekämpfungsversuche

Die Unzulänglichkeit dieser Verfahren, die seuchenhafte Ausbreitung einiger wirtschaftlich bedeutsamer Viruskrankheiten zu verhüten, lenkt die Aufmerksamkeit immer wieder auf das Problem der aktiven Bekämpfung ihrer Erreger.

In dieser Richtung sind verschiedene physikalisch-chemische Versuche durchgeführt worden. Der erste Bericht über die Hitze-Inaktivierung eines Virus wird von ALLARD (1) gegeben; er konnte schon 1917 das Mosaikvirus des Tabaks durch Dämpfung des Bodens zerstören. HOLMES (21) goß mosaikkranke Tabakpflanzen täglich mit 5 ccm einer 0,01%igen Thiouracil-Lösung, nachdem die Primärsymptome erschienen waren; er konnte dadurch eine systemische Erkrankung verhindern. NORRIS (51) hatte in wenigen Fällen das X-Virus der Kartoffel durch Behandlung mit Malachitgrün abtöten können. Nach Angaben von STODDARD (67) läßt sich der Erreger der X-Krankheit des Pfirsichs inaktivieren, indem kranke Okulationsreiser in bestimmte Chemikalien getaucht werden. Diese Behandlungsweisen haben zwar im Versuchsstadium eine gewisse Heilwirkung gezeigt, doch war der Erfolg nie so eindeutig, daß eine Anwendung unter praktischen Verhältnissen empfohlen werden konnte. Außerdem ist es möglich, daß die normalen Stoffwechselvorgänge in der Pflanze durch die Zuführung von Chemikalien verändert werden, so daß nicht feststeht, ob die angewendeten Mittel einen direkten inaktivierenden Einfluß auf den virösen Erreger ausgeübt haben.

Neben diesen Bekämpfungsversuchen in situ sind in weitaus größerer Zahl Untersuchungen an gereinigtem Virusmaterial durchgeführt worden, um grundlegende Fragen im Verhalten der Viren gegenüber chemischen und physikalischen Behandlungen zu klären. Es wurde der inaktivierende Einfluß von Röntgen- und UV-Strahlen, Beschallung, Chemikalien organischer und anorganischer Herkunft, hohen Drucken u. a. geprüft. Die Ergebnisse solcher Versuche dürfen jedoch nur unter Vorbehalt auf Verhältnisse in der lebenden Pflanze oder im Preßsaft übertragen werden. Ein Beispiel dafür bietet ein Versuch, in dem Arthur und Newell (2) das gereinigte Tabakmosaik-Virus im ultra-violetten Lichtbogen inaktivierten; es gelang ihnen jedoch nicht, das Virus im Pflanzengewebe auf diese Weise abzutöten.

2. Bekämpfungsversuche durch Wärmebehandlung

Als einzige Behandlungsart zur unmittelbaren Bekämpfung pflanzenpathogener Viren hat sich die Anwendung von trockener und feuchter Wärme mehr und mehr Raum erobern können. Die guten Erfolge an verschiedenen viruskranken Kulturpflanzen lassen erwarten, daß die Wärmetherapie zu den Methoden gehören wird, mit denen die auf diese Weise zugänglichen Viruskrankheiten in kontrollierbaren Grenzen zu halten sein werden.

Die ersten Bekämpfungsversuche in großem Ausmaß wurden durch das verheerende Auftreten der *Sereh*-Krankheit des Zuckerrohrs auf Java ausgelöst. Untersuchungen von Wilbrink (72), Knust (37) und Houtman (23) zeigten, daß Stecklinge für dauernd geheilt werden konnten, wenn sie von 30 min bis zu 1 Stunde in Wasser von 50 ^{0} bzw. 52 ^{0}C getaucht wurden. Ähnliche Erfolge erzielten King (33) und Martin (46) bei der Bekämpfung der virösen Verzwergung und der chlorotischen Streifenkrankheit des Zuckerrohrs. Diese Versuche sind mit einer großen Anzahl von Stecklingen durchgeführt worden; es läßt sich deshalb als allgemeingültige Regel ableiten, daß die Bekämpfung pflanzenpathogener Viren durch Wärmebehandlung mit gutem Erfolg möglich ist. Dies läßt weiterhin den Schluß zu, daß durch ähnliche Behandlung auch andere Viren in verschiedenen Kulturpflanzen bekämpft werden können. Es lag nahe, die Wärmebehandlung besonders bei viruskranken Pflanzen anzuwenden, die mehrjährig sind oder vegetativ vermehrt werden. Einen Anstoß zu Versuchen in dieser Richtung gab die Beobachtung, daß an Pfirsichbäumen, die an der Vergilbungs- und der Rosettenkrankheit litten, in den heißen Sommermonaten im Süden der USA die Symptome verschwanden, während dies in den Nordstaaten nie beobachtet wurde. Kunkel (41) konnte diese Erscheinung durch seine Untersuchungen erklären, in denen er erkrankte, getopfte Pfirsichbäumchen (zwei Wochen bei 34,4 ^{0} bis 36,3 ^{0}C) sowie infizierte Okulationsreiser (10 min in Wasser von 50 ^{0}C) heilte. Mit diesen Methoden gelang es, beim Pfirsich die Erreger der Vergilbungskrankheit, der Rosettenkrankheit, der Kleinfrüchtigkeit und der Rotfleckigkeit zu inaktivieren. Eine Warmwasserbehandlung führte gleichfalls zum Erfolg, als Hutchins und Rue (24) sowie Nichols und Nyland (50) Versuche zur Bekämpfung der progressiven Zwergwüchsigkeit bzw. der Blattrollkrankheit des Pfirsichs durchführten. Ein Bericht von Boyer u. a. (11) beweist, daß die

Wärmetherapie zur Bekämpfung der Virosen beim Pfirsich in der Praxis bereits angewendet wird; sie berichten, daß dadurch die Viruskrankheiten von 1,19 % (1939) auf 0,2 % (1948/49) zurückgingen.

Weiterhin konnten gute Erfolge an Erdbeeren, die mit den Erregern der verschiedenen Formen der Kräuselkrankheit infiziert waren, durch Wärmebehandlung erzielt werden. Da die Pflanzen gegen die Einwirkung feuchter Wärme recht empfindlich sind — 35 °C wurden nur sieben Stunden ertragen —, hielten POSNETTE (54) und POSNETTE u. a. (55) ihre Versuchspflanzen im Trockenofen bei 37 °C und konnten nach einer Einwirkungszeit von acht Tagen den zuverlässigsten Heileffekt feststellen; nach zwölf Tagen machten sich allerdings bereits nachhaltige Schädigungen an den so behandelten Pflanzen bemerkbar. Die gleiche optimale Einwirkungsdauer bestätigten auch FULTON (14, 15) und BOVEY (10). Bei allen Versuchen zur Bekämpfung der Erdbeervirosen konnten durch trockene Wärme weitaus bessere Erfolge erzielt werden, als wenn die Pflanzen in Wasser der gleichen Temperatur eingetaucht wurden. Daraus kann geschlossen werden, daß Viren in Pflanzen, die im Wachstum stehen bzw. ihre Entwicklung noch nicht abgeschlossen haben, für eine Behandlung durch trockene Wärme besonders zugänglich sind; durch eine Erwärmung im Wasserbad können dagegen Viren in ruhenden Pflanzenteilen, wie sie als vegetative Vermehrungsorgane bei vielen Kulturpflanzen Verwendung finden, angegriffen werden.

Bei den Abbaukrankheiten der Kartoffel ist von verschiedenen Seiten der Versuch unternommen worden, einer Ausbreitung der wirtschaftlich bedeutsamen Virosen durch die Anwendung der Wärmetherapie entgegenzuwirken. Die erste Arbeit darüber liegt aus dem Jahre 1923 vor: BLODGETT (9) prüfte, ob die Abtötungskurve für die Kartoffelknolle diejenige für das X-Virus oder das Blattroll-Virus schneidet und damit eine Wärmetherapie überhaupt möglich wird. Er stellte zwar ein Zusammentreffen der Kurven fest, jedoch konnten die Knollen innerhalb eines erträglichen Temperaturbereichs von den Viruskrankheiten nicht geheilt werden. Genauere Untersuchungen darüber führte KASSANIS (30) nun in letzter Zeit durch. Er konnte in einem Versuch, in dem blattrollkranke Knollen bei 37,5 °C in feuchter Atmosphäre lagerten, feststellen, daß das Virus nach 25 Tagen in den Knollen inaktiviert war. Ähnliche Versuche in Wasser der gleichen Temperatur schlugen fehl. PFEIL und KANNENGIESSER (52) prüften diese Ergebnisse bei der Sorte Ackersegen nach und fanden, daß nur 50 % der Knollen nach 25 Tagen bei einer Temperatur von 37,5 °C als gesund zu bezeichnen waren. Diese Unterschiede sind anscheinend sortenbedingt und hängen weiterhin davon ab, an welchem Standort und unter welchen Witterungsbedingungen die betreffende Sorte aufgewachsen war. Versuche mit dem X- und dem Y-Virus blieben sowohl bei der Warmluft- wie bei der Warmwasserbehandlung ohne Erfolg (KASSANIS, 32; SALZMANN, 61; JOHNSON, 26); auch Untersuchungen von BAWDEN u. a. (6), das paracrincle-Mosaik-Virus der Kartoffel in vivo durch Wärme zu zerstören, führten zu keinem befriedigenden Ergebnis.

In ähnlicher Weise wie KUNKEL Beziehungen zwischen hohen sommerlichen Temperaturen und der Gesundung viruskranker Pfirsichbäume erkannt hatte, beobachtete THIRUMALACHAR (68) in Indien, daß der Nachbau von blattrollkrankem Kartoffelpflanzgut, das bei hohen sommerlichen Temperaturen lagerte, zu 100 % gesund aufwuchs. Er vermutete, daß dieser Gesundungsprozeß auf den andauernden Einfluß hoher Temperaturen zurückzuführen sei und fand seine Annahme durch Untersuchungen bestätigt, in denen blattrollkrankes Pflanzgut in dunklen Hütten von April bis Oktober lagerte, wobei im Mai und Juni Maximaltemperaturen von 41,7 °C verzeichnet und 30 °C nie unterschritten wurden.

Es war anzunehmen, daß mit dem Samen übertragbare Viren durch eine Wärmebehandlung besonders leicht angreifbar sind. Die Samen besitzen im Ruhezustand eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen äußere Einflüsse; daher durfte erwartet werden, daß sie eine solche Behandlung auch für längere Zeit ohne Schaden überstehen. Die Verhältnisse können jedoch nur an Viren untersucht werden, bei denen sicher nachgewiesen ist, daß sie zu einem hohen Prozentsatz mit dem Saatgut übertragbar sind. REDDICK und STEWARD (58) konnten jedoch bei ihren Versuchen mit dem Erreger der Mosaikkrankheit der Bohne (*Phaseolus* virus 1 Sm.), in denen sie Temperaturen von 60 ° bis 90 °C bei jeweils verschiedener Einwirkungsdauer prüften, keine Inaktivierung erzielen; wenn die Bohnen die Hitzebehandlung überlebten, persistierte auch das Virus noch. FAJARDO (13) bestätigte diesen Befund. Es ist bekannt, daß die nativen Eiweißverbindungen des Samens durch den Reifevorgang allgemein widerstandsfähiger werden. Da es nicht gelungen war, die infizierten Bohnen zu heilen, kann daraus geschlossen werden, daß auch das Viruseiweiß eine gleiche Umwandlung erfahren hat und resistenter wurde.

Aus einem Bericht von der Tagung über pflanzliche Viruskrankheiten 1940 in Moskau (zit. nach BARTELS, 3) geht hervor, daß Tabaksamen durch eine Hitzebehandlung von einigen Viren befreit werden konnten. Nun ist bis heute jedoch noch kein Beweis für eine Samenübertragung bei den Viruskrankheiten des Tabaks erbracht worden, und es ist daher nicht ausgeschlossen, daß in diesen positiv verlaufenen Versuchen lediglich eine Verschmutzung des Samens vorgelegen hat.

Aus den Ergebnissen der angeführten Arbeiten läßt sich zusammenfassend feststellen:

1. Eine Wärmetherapie ist bei mehreren viruskranken Pflanzen gelungen. Man kann daraus schließen, daß ein gleicher Erfolg bei anderen Viren in verschiedenen Kulturpflanzen möglich ist.
2. Alle praktischen Arbeiten auf diesem Gebiet waren Testversuche, d. h. die Bedeutung bestimmter Größenveränderungen in den Beziehungen zwischen Temperaturverminderung bzw. -erhöhung und Einwirkungsdauer ist bisher kaum erfaßt oder beim Versuchsansatz berücksichtigt worden.

Daher ist es erwünscht, durch Feststellung des Verlaufs der Hitze-Inaktivierung eines Virus in vitro genaueren Einblick in die allgemeinen Voraus-

setzungen für eine Wärmetherapie zu gewinnen. Unter diesem Gesichtspunkt ist in den nachfolgenden Versuchen die Klärung folgender Fragen angestrebt worden:

1. Besteht bei einer Inaktivierung eine Korrelation zwischen Zeit und Temperatur?
2. Läßt sich eine Abhängigkeit zwischen Zeit und Temperatur statistisch sichern, und kann daraus ein charakteristischer Kurvenverlauf hergeleitet werden?
3. Bewirkt eine Erwärmung bei verminderter Temperatur einen so raschen „Abbau" des Virus, daß eine Inaktivierung — und damit eine Wärmetherapie — zeitlich überhaupt möglich ist?
4. Wie wirkt sich eine Verdünnung des virushaltigen Preßsaftes auf den Kurvenverlauf aus?

Ob sich die gewonnenen Erkenntnisse direkt oder erst nach einer Umwertung für den praktischen Gebrauch verwenden lassen, bedarf besonderer Erörterung. Schließlich bleibt zu prüfen, ob die Befunde aus derartigen Untersuchungen geeignet sind, ergänzende Merkmale zur Klassifizierung der betreffenden Viren aufzuzeigen.

Ein interessantes Problem, welches das Arbeitsgebiet der Biochemie berührt, kann hier nur andeutungsweise erwähnt werden: Die Erklärung der Vorgänge des Inaktivierungsprozesses. Der Biologe stellt lediglich den Verlust der Infektiosität fest; was geschieht aber mit dem Viruseiweiß, das doch anscheinend der Träger der Infektiosität war? Bleibt dieser Komplex im äußeren Zusammenhang bestehen, könnten diese Fremdkörper — selbst wenn sie durch biologische Tests oder mit anderen Methoden nicht mehr nachweisbar sind — Schäden in den Zellfunktionen einer geheilten Pflanze hervorrufen; auch eine Reinfektion könnte sehr leicht haften, da ja bereits Vorstufen des infektiösen Viruseiweiß vorhanden sind. Solche Beobachtungen sind bisher jedoch nicht gemacht worden. Deshalb scheint die Annahme gerechtfertigt, daß die gleichen Vorgänge, die eine Synthese des Virus ermöglicht haben, nun rückläufig die Wirksamkeit und den Zusammenhalt der Partikeln aufheben, so daß sämtliche Bausteine wieder auf ursprüngliche Zellbestandteile zurückgeführt werden. Ein Beweis steht auch hierfür noch aus.

B. Material und Methoden

Bei der Auswahl des Virusmaterials wurden das Tabakmosaik-Virus (TMV) und das Levkojen-Virus für die Versuche bestimmt. Das TMV ist bis heute das am besten untersuchte pflanzenpathogene Virus. Daher ist bekannt, daß es in vitro lange haltbar ist und eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen Hitze besitzt. Dieses Virus bietet also die Möglichkeit, Temperatureinwirkungen in einem weiten Bereich zu beobachten, ohne Störungen durch natürliche Alterung oder enge Empfindlichkeitsgrenzen befürchten zu müssen.

Im Gegensatz zu diesem Typ stand in dem Levkojen-Virus ein Erreger zur Verfügung, der durch einen niedrigen Hitze-Inaktivierungspunkt und frühzeitige Alterung völlig andere Reaktionen erwarten ließ.

1. Herkunft und Einordnung der Stämme

Die Erhitzungsversuche mit dem TMV (*Nicotiana* virus 1 Sm.; *Marmor tabaci* Holmes) im Preßsaft kranker *Nicotiana tabacum* var. *Samsun* wurden mit einem Stamm durchgeführt, der im Institut für gärtnerische Virusforschung der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft isoliert worden war.

In Vorversuchen wurde der Hitze-Inaktivierungspunkt bei 92 ° bis 93 °C und die Verdünnungsgrenze bei 1 : 900 000 festgestellt. Dieser Stamm ist nach den Untersuchungen von Uschdraweit (71) in die Ss-Gruppe des TMV einzureihen; er ruft also auf *Nicotiana silvestris* eine systemische Erkrankung hervor im Gegensatz zu der Sn-Gruppe, deren Vertreter auf dieser Testpflanze Primärläsionen erzeugen.

Das Ausgangsmaterial für die Untersuchungen an dem zweiten Virus — einer Variante des Levkojen-Virus (*Matthiola* virus 1 Tompk. Sm.; *Marmor matthiolae* Holmes) — stammte von einer *Alliaria officinalis.* Diese Pflanze stand in der Nähe einer Rabatte, auf der einige Levkojen mehr oder weniger starke Gestaltsveränderungen mit gleichzeitiger Mosaikscheckung aufwiesen, was auf eine Infektion mit dem Levkojen-Virus hindeutete. Daneben traten auf dem Blattwerk dieser Pflanzen jedoch untypische Nekrosen auf, die durch ein zweites Virus hervorgerufen sein konnten. Um die schwierige Trennung eines zum Teil unbekannten Virusgemisches aus den Levkojen zu umgehen, wurde die *Alliaria officinalis,* die starke Mosaikzeichnung auf teilweise verkümmerten, blasig aufgetriebenen Blättern zeigte, als Virusquelle benutzt (Abb. 1). Auf *Matthiola incana* ruft diese Isolierung das typische Symptombild des Levkojen-Virus hervor: allgemeine Wachstumshemmung, Kräuselung, Verdrehung und Mosaikscheckung der Blätter sowie ein ausgeprägtes Brechen der Blütenfarbe (Abb. 2 u. 3). In keinem Falle konnten die bei den Freilandpflanzen beobachteten Nekrosen festgestellt werden. Bei Übertragung dieses Virus auf eine Reihe von Testpflanzen (*Nicotiana tabacum, Nicotiana glutinosa, Chenopodium quinoa, Brassica rapa rapifera, Gomphrena globosa*) im Gewächshaus traten



Abb. 1. *Alliaria officinalis.* Aus dieser Pflanze wurde der in den Untersuchungen verwendete Stamm des Levkojen-Virus isoliert



Abb. 2. Levkojen. Zusammenbruch nach Frühinfektion mit dem verwendeten Stamm des Levkojen-Virus; links: gesund



Abb. 3. Typische Symptome auf Levkojenblättern nach Infektion mit dem verwendeten Stamm des Levkojen-Virus

die typischen Merkmale so regelmäßig auf, daß offenbar ein reiner Stamm des Levkojen-Virus vorlag.

Der Hitze-Inaktivierungspunkt wurde bei 56 ⁰ bis 58 ⁰C und die Verdünnungsgrenze bei 1 : 12 000 ermittelt. In Alterungstesten lagerte infektiöser Preßsaft bis zur Wirkungslosigkeit, die bei einer Temperatur von etwa 22 ⁰C nach 22 Tagen und 20 Stunden eingetreten war; bei einer Temperatur von — 13 ⁰C war das Virus noch nach 275 Tagen infektiös.

Bei der großen Zahl der bisher von Kruziferen isolierten Viren ist es schwierig, aus den Veröffentlichungen verschiedener Forscher eine klare Abgrenzung zu finden. POUND und WALKER (56) haben versucht, eine grobe Einteilung an Hand von Differentialwirten und temperaturbedingten Symptomveränderungen vorzunehmen; sie verwendeten dafür weiterhin die Ergebnisse aus den Bestimmungen der physikalischen Eigenschaften und unterschieden die folgenden Gruppen:

	Gruppe I	Gruppe II
Hitze-Inaktivierungspunkt	50 ° bis 68 °C	75 ° bis 80 °C
Verdünnungsgrenze	1 : 600 bis 1 : 100 000	1 : 1500 bis 1 : 6000
Alterungsbeständigkeit	48 bis 384 Stunden	—
Kruziferen als Wirt	unter anderen	ausschließlich
Primärläsionen auf Tabak	ja	nein

Das eigene Virusmaterial kann demnach zur Gruppe I gestellt werden; als bemerkenswerter Unterschied ist jedoch hervorzuheben, daß POUND und WALKER bei zwei geprüften Levkojenstämmen keine Infektion auf einigen Arten der Gattung *Brassica* erzielen konnten, während die eigene Isolierung eine heftige Erkrankung auf Blumenkohl hervorruft (Abb. 4 u. 5).

2. Behandlung des Preßsaftes; Testpflanzen

Der Rohsaft aus beiden Pflanzenarten wurde bei 5000 U/min zentrifugiert und das Überstehende zur weiteren Verwendung sofort abgegossen. Es war nun zu klären, in welcher Weise die Proben erhitzt werden sollten. Die Mehrzahl der Autoren (HOGGAN, 19; GRAINGER und COCKERHAM, 18; KÖHLER, 34) benutzten Glasröhrchen, die mit einem Korkstopfen verschlossen wurden. MCKINNEY (47) hat zuerst diese Art der Erhitzung angegeben, die auch allgemein ausreicht, wenn der Hitze-Inaktivierungspunkt eines Virus bei einer Testzeit von 10 min festgestellt werden soll. Da die Virusproben bei den eigenen Versuchen bedeutend länger im Wasserbad gehalten wurden — in zwei Serien über 200 Tage —, war es erforderlich, die Teströhrchen auf andere Weise zu verschließen, zumal es bei einem Fehlschlag während einer solchen Zeitdauer fast unmöglich war, den Versuch zu wiederholen. Deshalb wurden je 0,75 ccm Preßsaft mit einer Injektionsspritze in 1-ccm-Ampullen eingebracht, diese mit einem selbsthergestellten Gebläse verschmolzen und sofort vorsichtig in kaltem Wasser abgekühlt. Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß eine meßbare Erhitzung des Saftes beim Verschmelzen der Ampullen und damit eine ungewollte Teilinaktivierung nicht eingetreten war.



Abb. 4. Blumenkohl; Infektion mit dem verwendeten Stamm des Levkojen-Virus. Pflanzen gleichen Alters, links: gesund



Abb. 5. Blumenkohl; frühe Blattsymptome nach Infektion mit dem verwendeten Stamm des Levkojen-Virus

Die Virusproben wurden in einem elektrisch beheizten Wasserbad erhitzt, das mit einem Rührwerk ausgestattet war; die Temperatur schwankte im mittleren Bereich nur um ± 0,02 °C. Die Ampullen wurden in Schellen eines besonderen Einsatzbehälters geklemmt, der dem kreisenden Wasser kein erhebliches Hindernis entgegensetzte, so daß die Proben laufend von Wasser gleichmäßiger Temperatur umspült waren. Für einen Versuch bei einer bestimmten Temperatur mußten mehrere Ampullen gleichzeitig erhitzt werden, um eine gewisse Zeitspanne testen zu können, in der die Inaktivierung zu erwarten war. Deshalb wurden bei jeder Temperaturstufe je 14 Ampullen gleicher Füllung in das Wasserbad eingesetzt und zu dem gewünschten Zeitpunkt entnommen. Da die Zeit in eine logarithmische Skala eingetragen wurde, war der Abstand zwischen zwei Entnahmezeiten so gering, daß bei der Bonitierung zwischen dem letzten positiven und dem ersten negativen Ergebnis gemittelt werden konnte. Die Sicherheit eines jeden Mittelwertes war mit den Ergebnissen der vorangegangenen sowie der nachfolgenden Proben erwiesen.



Abb. 6. Typische Primärläsionen nach Infektion mit dem verwendeten Stamm des TMV auf Blättern von *Nicotiana glutinosa*; links: Verdünnung 1 : 1000; rechts: unverdünnt

Um die tatsächliche Inaktivierungszeit in jedem Falle genau zu erfassen, mußte d i e Zeit berücksichtigt werden, welche der Ampulleninhalt braucht, um sich der Temperatur des umgebenden Wassers anzugleichen; Versuche mit einem in eine Ampulle eingeführten Thermometer ergaben, daß diese Zeit 35 sec betrug.

Die Versuche wurden mit dem TMV in fünf Verdünnungsstufen — Unverdünnt, 1 : 2, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 — und mit dem Levkojen-Virus in zwei Verdünnungsstufen — Unverdünnt, 1 : 100 — durchgeführt. Damit konnte der Einfluß einer fortschreitenden Verdünnung auf den Verlauf der Inaktivierungskurve beobachtet werden; außerdem waren die erhaltenen Werte schon als grob gesichert anzusehen, wenn der Kurvenverlauf in allen Serien ein annähernd gleiches Bild ergab.

Als Testpflanzen wurden für die Untersuchungen mit dem TMV *Nicotiana glutinosa* — diese Tabakart reagiert auf eine Infektion mit typischen Primärläsionen (Abb. 6) —, *Nicotiana tabacum* var. *Samsun* und *Datura stramonium* verwendet; für das Levkojen-Virus hat sich *Nicotiana tabacum* var. *Samsun* als guter Differentialwirt gezeigt (Abb. 7), außerdem diente *Chenopodium quinoa* als Kontrollpflanze. Die Übertragung des behandelten Preßsaftes auf die Testpflanzen erfolgte nach der Glasspatelmethode; Abrasionsmittel wurden beim TMV nicht verwendet, da Testversuche ergaben, daß die Zahl der Läsionen dadurch nur unbedeutend ansteigt. Beim Levkojen-Virus war es dagegen zweckmäßig, Karborundstaub auf die Impfblätter aufzutragen.



Abb. 7. Nekrotische Primärläsionen auf einem Blatt von *Nicotiana tabacum* var. *Samsun* nach Infektion mit dem verwendeten Stamm des Levkojen-Virus

C. Versuche

Johnson (27) hat mit Nachdruck darauf hingewiesen, daß der „Grad der Widerstandsfähigkeit, den ein Virus gegenüber äußeren Faktoren aufweist, für die betreffende Virusart kennzeichnend ist und daher eines der wesentlichsten Merkmale für die Systematik der Virusarten zu liefern vermag“. Im Zusammenhang damit ist besonders die Temperaturempfindlichkeit geprüft worden, wobei die Untersuchungen sich im wesentlichen auf die Festlegung der Hitze - Inaktivierungs-Temperatur eines Virus im Preßsaft einer kranken Pflanze beschränkten. Wenig ist über die Hitze-Inaktivierungs-Z e i t eines Virus bekannt, welche nach Price (57) „die geringste Zeitspanne ist, in der ein virushaltiger Preßsaft bei einer gegebenen Temperatur und unter vergleichbaren Bedingungen sein Infektionsvermögen restlos einbüßt“.

BAWDEN (4) weist darauf hin, daß diese Größen eine unterschiedliche Wertigkeit besitzen, die sich sowohl nach den äußeren Bedingungen wie dem physiologischen Zustand der Testpflanzen ändern kann. Steht die Hitze-Inaktivierungstemperatur für die systematische Kennzeichnung eines Virus im Vordergrund des Interesses, so gewinnt die Hitze-Inaktivierungszeit besondere Bedeutung dann, wenn es sich um die Wärmetherapie viruskranker Pflanzen handelt. Hier kommen nur Temperaturen in Betracht, die von lebenden Pflanzen bzw. Pflanzenteilen ohne ernstliche Schädigung so lange ertragen werden, wie es zur Inaktivierung des betreffenden Virus erforderlich ist. Untersuchungen über das Verhalten der Viren gegenüber derartigen Temperaturen sind also die Voraussetzung für eine systematische Anwendung der Wärmebehandlung in der Praxis.

1. Tabakmosaik-Virus

Es ist bewiesen, daß die Verdünnung eines virushaltigen Preßsaftes den Hitze-Inaktivierungspunkt erniedrigt (MC KINNEY, 48; UPPAL, 70). Im Hinblick darauf sind die ersten eigenen Versuche zur Festlegung der Hitze-Inaktivierungszeit des TMV mit Preßsaft durchgeführt worden, der auf 1 : 1000 verdünnt war. Die Inaktivierungszeiten konnten so in verhältnismäßig kurzer Zeit auch bei niedrigen Temperaturen ermittelt werden. Damit war es möglich, Rückschlüsse auf den wahrscheinlichen Verlauf der Inaktivierungskurven in den geringeren Verdünnungsstufen zu ziehen, die ja einer beträchtlich längeren Einwirkungsdauer bei niedrigen Temperaturen bedürfen. BIGELOW (8) hat mit grundsätzlicher Gültigkeit den logarithmischen Charakter thermaler Abtötungskurven gezeigt; deshalb wurden die Ergebnisse der nachfolgenden Untersuchungen auf halblogarithmisches Papier aufgetragen. In Abbildungen 8 und 9 sind die Befunde aus den in fünf Verdünnungsstufen durchgeführten Versuchen des TMV graphisch dargestellt. Diese Ergebnisse wurden in Untersuchungen an 36 einzelnen Serien (S. 61) sowie 23

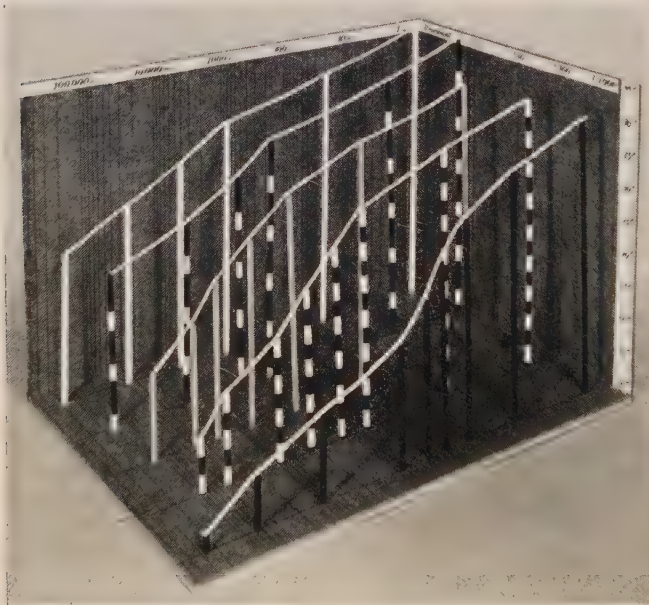


Abb. 8. Modell der Hitze-Inaktivierungskurven des TMV in fünf Verdünnungsstufen. Länge: Zeit in min (log); Höhe: Temperatur in °C; Tiefe: Verdünnungsstufen

Tabelle 1

Berechnung für die Versuchsergebnisse der Verdünnung 1 : 1000 des Tabakmosaik-Virus

Temperatur X		Zeit Y	x	y	x^2	y^2	xy	Regression Y	Y in min
(90° C)	1	0,06446	— 4	— 2,74270	+ 16	7,53240	+ 10,97080	0,34232	2,19
(85° C)	2	1,23045	— 3	— 1,57671	+ 9	2,48601	+ 4,73013	0,95853	9,1
(80° C)	3	1,95424	— 2	— 0,85292	+ 4	0,72747	+ 1,70584	1,57474	37
(75° C)	4	2,27875	— 1	— 0,52841	+ 1	0,27922	+ 0,52841	2,19095	155
(70° C)	5	2,54407	± 0	— 0,26309	0	0,06922	0	2,80716	641
(65° C)	6	2,92428	+ 1	+ 0,11712	+ 1	0,01372	+ 0,11712	3,42337	2 650
(60° C)	7	4,03345	+ 2	+ 1,22629	+ 4	1,50379	+ 2,45258	4,03958	10 954
(55° C)	8	4,82110	+ 3	+ 2,01394	+ 9	4,05595	+ 6,04182	4,65579	45 268
(50° C)	9	5,41364	+ 4	+ 2,60648	+ 16	6,79373	+ 10,42592	5,27200	187 070
$Sx = 45$ $x = 5$		$Sy = 25,26444$ $y = 2,80716$			$Sx^2 = 60$	$Sy^2 = 23,46151$	$Sxy = 36,97262$	$SY = 25,26444$ $y = 2,80716$	

Regressionskoeffizient $b = \frac{Sxy}{Sx^2} = \frac{36,97262}{60} = \log 0,61621 = \mathbf{4,13\ min}$

Korrelationskoeffizient $r = \frac{Sxy}{Sx^2 \cdot Sy^2} = \frac{36,97262}{60 \cdot 23,46151} = \mathbf{0,985}$

Mittlerer Fehler (s) der Regression $s^2 = \frac{1}{n-2} \cdot Sy^2 - \frac{S(xy)^2}{Sx^2} = \frac{1}{7} \cdot 23,46151 - \frac{1366,97463}{60} = \frac{1}{7} \cdot 0,67860 = 0,09694$

$s = 0,09694 = \log 0,31135 = \mathbf{2,05\ min}$

Bestimmtheitsmaß $B = \frac{S(xy)^2}{Sx^2 \cdot Sy^2} = \frac{1366,97463}{60 \cdot 23,46151} = \mathbf{0,971}$

t-Wert $t = \frac{b - \beta}{s} \cdot Sx^2 = \frac{0,61621 - 0}{0,31135} \cdot 60 = \mathbf{15,33}$

Wiederholungen gewonnen. Im Hinblick auf das Pflanzenmaterial erforderten diese Untersuchungen die Anzucht und Auslese von fast 4500 Pflanzen, von denen über 21 000 Blätter mit den jeweiligen Proben infiziert wurden.

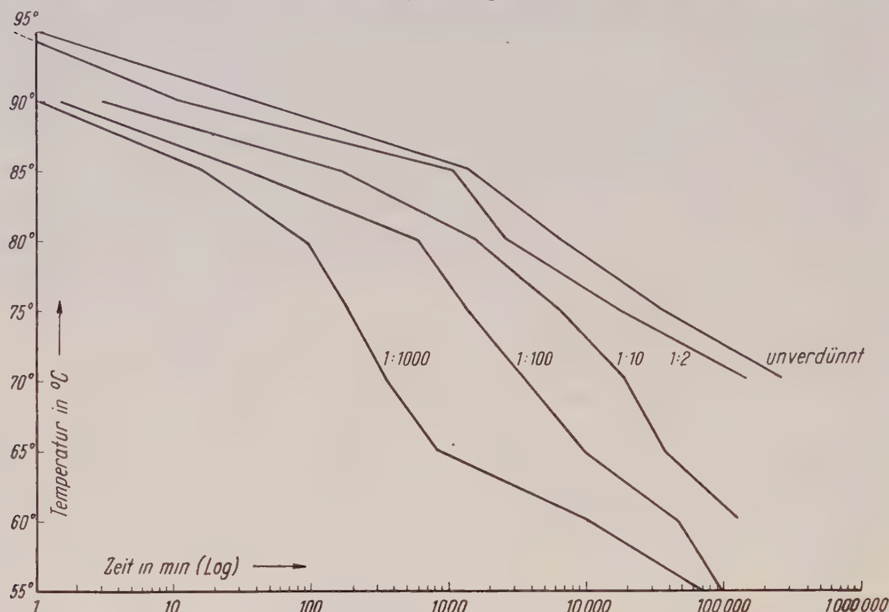


Abb. 9. Hitze-Inaktivierungskurven des Tabakmosaik-Virus

Der Verlauf der Kurven deutet darauf hin, daß eine Abhängigkeit zwischen den beiden geprüften Faktoren Temperatur und Zeit bestehen muß. Darüber hinaus ist aus dem gleichmäßigen Abfallen der Linien, das sich lediglich im Grad der Neigung voneinander unterscheidet, auf eine Beziehung zwischen den fünf dargestellten Kurven zu schließen. Ob nun diese Beziehungen sowie eine daraus abzuleitende Gesetzmäßigkeit tatsächlich bestehen, mußte eine Berechnung bestätigen; dabei war festzustellen, ob die erhaltenen Werte innerhalb der Vertrauensgrenzen einer Geraden liegen. Es war weiterhin zu prüfen, ob man aus dem relativ geringen Zahlenmaterial auch die Lage eines Punktes bei einer beliebigen Temperatur bestimmen könne. Der Verlauf der Kurven konnte durch die Berechnungen, bei denen die Verfahren von Snedecor (64), Koller (38) und Linder (44) angewendet worden sind, mit Sicherheit nur für die geprüften Temperaturspannen wiedergegeben werden.

Hier muß erwähnt werden, daß gewisse Bedenken bestanden, für einen dynamisch-biologischen Vorgang, an dem mehrere Faktoren beteiligt sind, eine allgemeingültige Regel anzuwenden. Wenn die Werte sich mathematisch so weit sichern ließen, daß sie ein allgemeines Urteil erlaubten, konnten jedoch mit einer solchen Berechnung einige grundlegende Voraussetzungen für die praktische Anwendbarkeit einer Wärmebehandlung gewonnen werden.

In Tabelle 1 ist die Berechnung für die Versuchsergebnisse der Verdünnung 1 : 1000 durchgeführt worden. Da nach Bigelow thermale Abtötungs-

kurven logarithmischen Charakter aufweisen und außerdem das Rechnen mit den direkten großen Zahlen nicht durchführbar war, wurden diese Werte logarithmiert, ein Verfahren, das nach KOLLER (39) die gleiche Gültigkeit hat wie die gewöhnliche lineare Auffassung.

Aus den Abweichungen von X (Temperatur) und Y (Zeit) und deren weiterer Berechnung wurden der Regressionskoeffizient $b = \frac{Sxy}{Sx^2}$ ermittelt sowie nach der Gleichung der Geraden $Y = \bar{y} - b\ (X - \bar{x})$ die Punkte der in Tafel 2 eingetragenen Regressionsgeraden bestimmt, die so durch alle gegebenen Werte in den einzelnen Verdünnungsserien verlaufen, daß die Summe der positiven und die Summe der negativen Abweichungen ein Minimum ergeben. Nach der Formel $s^2 = \frac{1}{n-2} \cdot Sy^2 - \frac{S(xy)^2}{Sx^2}$ konnte nun der mittlere Fehler der Regression (s) errechnet werden, der die Streuung der Werte um die Regressionsgerade angibt.

Es war nun wichtig zu prüfen, ob der berechnete Regressionskoeffizient für die durchschnittliche Zunahme der Zeit bei verminderten Temperaturen signifikant von 0 abweicht. Dazu wurde die Gegenhypothese mit der Frage gestellt: Sind die aus den relativ wenigen Meßwerten bestehenden Reihen im Rahmen der üblichen Zufallsgrenzen als Stichproben aus einer Gesamtheitsreihe mit horizontal verlaufender Geraden, in welcher der Regressionskoeffizient = 0 ist, aufzufassen? Über die Berechnung des t-Wertes $\left(t = \frac{b-\beta}{s} \cdot \sqrt{Sx^2}\right)$ konnte die Gegenhypothese verneint und damit festgestellt werden, daß aus den Beobachtungen mit sehr guter statistischer Sicherheit eine Zunahme der Zeit bei verminderten Temperaturen hervorgeht. In Tabelle 2 sind für die einzelnen Verdünnungen des TMV die berechneten t-Werte den Tabellenwerten der t-Verteilung bei den entsprechenden Freiheitsgraden gegenübergestellt.

Tabelle 2

Sicherung der geradlinigen Zunahme der Zeit bei verminderten Temperaturen durch die t-Verteilung

Verdünnungsstufe	Berechneter t-Wert	FG	Verteilung von t bei einem P von 0,001
Unverdünnt	10,74	4	8,61
1 : 2	9,53	4	8,61
1 : 10	7,35	5	6,86
1 : 100	8,23	6	5,96
1 : 1000	15,33	7	5,41

Als weitere wesentliche Prüfung wurde die Abhängigkeit zwischen X (Temperatur) und Y (Zeit) festgestellt. Zu jedem X gehören im allgemeinen mehrere Punkte von Y, deren Lage durch die Streuung bedingt ist. Im Grenzfall können alle Punkte auf der Regressionsgeraden liegen; zu jedem Wert

von X gehört dann nur ein einziger Wert von Y, und es besteht eine strenge lineare Abhängigkeit. Je enger sich die Punkte um die Regressionsgerade scharen, desto schärfer ist diese bestimmt. Es läßt sich nun ein Bestimmtheitsmaß berechnen, indem man ermittelt, welchen Anteil die Streuung der Punkte der Regressionsgeraden von der gesamten Streuung der Y-Werte ausmacht (Bestimmtheitsmaß $B = \frac{S(xy)^2}{Sx^2 \cdot Sy^2}$). Das Bestimmtheitsmaß B kann auch direkt in % ausgedrückt werden; es bedeutet dann in der Serie „Unverdünnt" ein $B = 0{,}966$, daß 96,6 % der Streuung von Y (Zeit) sich aus Veränderungen von X (Temperatur) durch lineare Regression erklären lassen. Durch die Werte der Sicherheitspunkte für B sind die Bestimmtheitsmaße sehr gut statistisch gesichert. Tabelle 3 enthält für die fünf Verdünnungsstufen des TMV die Korrelationskoeffizienten ($r = b \cdot \frac{Sx}{Sy}$) und die Bestimmtheitsmaße (B); für diese sind außerdem noch die Sicherheitspunkte bei einer Wahrscheinlichkeit von 0,1 % angegeben.

Tabelle 3

Korrelationskoeffizienten und Bestimmtheitsmaße für die Abhängigkeit zwischen Temperatur und Zeit bei fünf Verdünnungsstufen des TMV

Verdünnungsstufe	FG	r	B	Sicherheitspunkte für B ($P = 0{,}001$)
Unverdünnt	4	0,983	0,966	0,949
1 : 2	4	0,978	0,956	0,949
1 : 10	5	0,953	0,908	0,904
1 : 100	6	0,956	0,913	0,855
1 : 1000	7	0,985	0,971	0,807

Die Berechnungen haben somit den Beweis erbracht, daß der Verlauf der Inaktivierungskurven des TMV in allen geprüften Verdünnungen eine Gerade darstellt und nach einer Gleichung ersten Grades bestimmt werden kann.

In Tabelle 4 sind die Inaktivierungszeiten — einschließlich der regressiven Werte — zusammengestellt, die bei den geprüften Temperaturen und Verdünnungen erhalten wurden. Die graphische Darstellung der daraus sich ergebenden Inaktivierungskurven ist aus Abbildungen 9 und 10 zu ersehen. Wegen der gleichen Behandlungsart konnte darauf verzichtet werden, den Berechnungsvorgang für alle Verdünnungsserien zu wiederholen; Tabelle 5 gibt zur Erläuterung die Werte der Regressionskoeffizienten und des mittleren Fehlers der Regressionen wieder.

In der Serie „Unverdünnt" bedeutet z. B. ein $b = 11{,}03$ min, daß die Regressionsgerade bei einer Temperaturänderung von $\pm 5\,^0$C nach der Gleichung der Geraden $Y = \bar{y} - b\,(X - \bar{x})$ um 11,03 min — als horizontaler Abstand von der Regressionslinie gemessen — ansteigt bzw. abfällt.

Bei allen Verdünnungsserien sind im Kurvenverlauf gleichmäßige Abweichungen von den Regressionslinien festzustellen. Während bei relativ hohen Temperaturen die Inaktivierungszeiten oberhalb der Regressionsgera-

Tabelle 4

Hitze-Inaktivierungszeiten in Minuten des Tabakmosaik-Virus in fünf Verdünnungsstufen bei Temperaturen von 95°C bis 50°C

( ) = Werte der Regressionsgeraden

Temperatur	Unverdünnt	1 : 2	1 : 10	1 : 100	1 : 1000
95 °C	1,1 (3,1)	0,75 (1,58)	—	—	—
90 °C	40 (34)	11 (17)	3 (18,5)	1,5 (7,9)	1,16 (2,19)
85 °C	1 380 (375)	1 080 (186)	160 (93)	35 (34)	17 (9,1)
80 °C	6 480 (4 133)	2 640 (2 022)	1 560 (472)	600 (144)	90 (37)
75 °C	36 000 (45 588)	16 020 (21 952)	6 480 (2 380)	1 320 (612)	190 (155)
70 °C	266 400 (502 745)	141 840 (238 321)	19 020 (12 015)	3 720 (2 601)	350 (641)
65 °C	—	—	37 440 (60 660)	9 360 (11 047)	840 (2 650)
60 °C	—	—	125 280 (306 140)	47 520 (46 915)	10 800 (10 954)
55 °C	—	—	—	93 600 (199 250)	66 240 (45 268)
50 °C	—	—	—	—	259 200 (187 070)

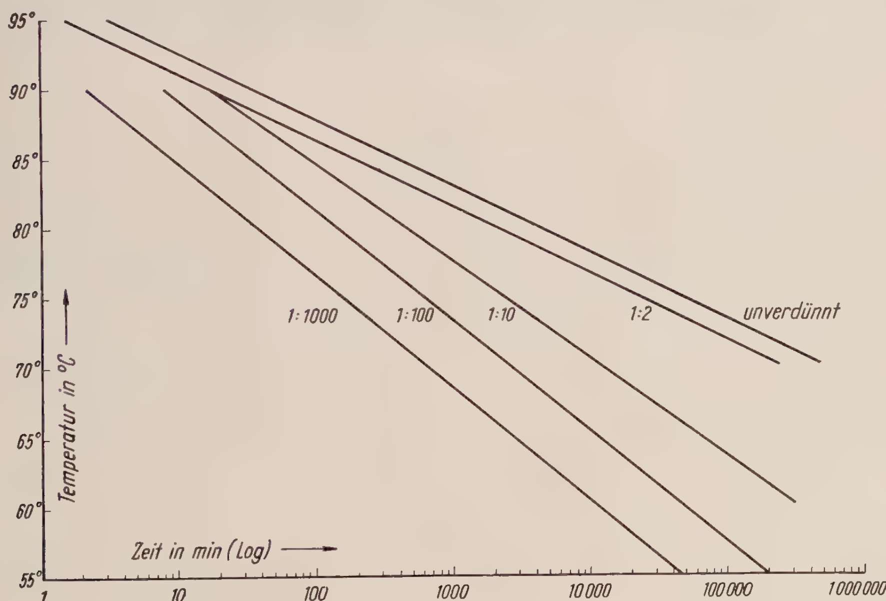


Abb. 10. Hitze-Inaktivierungskurven des Tabakmosaik-Virus. Regressionslinien

Tabelle 5

Regressionskoeffizienten und mittlerer Fehler der Regressionslinien für die Inaktivierungskurven des TMV

Verdünnungsstufe	Regressions-koeffizient (*b*)	Mittlerer Fehler der Regression (*s*)
Unverdünnt	11,03 min	2,54 min
1 : 2	10,85 min	2,83 min
1 : 10	5,05 min	3,19 min
1 : 100	4,24 min	3,13 min
1 : 1000	4,13 min	2,05 min

den liegen, können sie bei verminderter Temperatur allgemein unterhalb dieser Geraden beobachtet werden. Die Serien geringerer Konzentration lassen erkennen, daß dieser Vorgang bei weiterer Temperaturerniedrigung in gleicher Weise weiterverläuft, wobei zu beachten ist, daß diese Erscheinung durch die höhere Verdünnung hier schon bei niedrigeren Temperaturen eintritt. Die Gleichmäßigkeit dieser Schwankungen macht es wahrscheinlich, daß es sich bei diesem Vorgang nicht um eine zufällige Abweichung innerhalb der Fehlergrenzen, sondern um eine echte biologische Veränderung der Viruspartikeln handelt, die folgendermaßen gedeutet werden kann: POLLARD (53) bezeichnet ein Virus als ein Aggregat von Molekülen, von denen jedes eine Funktion besitzt oder bei einer Funktion eine Rolle spielt. Danach können gewisse Bausteine des Virus bei einer bestimmten Temperatur so verändert werden, daß sie die Fähigkeit zur Ausübung einer spezifischen Funktion verlieren; andere Teile dieses Virus hingegen bleiben bei dieser Temperatur noch unverändert. Mit der Annahme einer unterschiedlichen Temperaturempfindlichkeit einzelner Bausteine eines Virus können diese gleichmäßigen Abweichungen verständlich werden.

2. Levkojen-Virus

Untersuchungen an dem Levkojen-Virus wurden in gleicher Weise vorgenommen. In 37 Serien mußte der behandelte Preßsaft von 580 Ampullen auf die Blätter von rund 2300 Pflanzen abgerieben werden. An Hand der Symptome dieser spezifisch auf den Virusbefall reagierenden Testpflanzen ergaben sich die in Tabelle 6 wiedergegebenen Hitze-Inaktivierungszeiten.

Die weiteren Berechnungen sind in der gleichen Weise wie beim TMV durchgeführt worden. In der Serie „Unverdünnt“ konnte der Regressionskoeffizient mit $b = 2{,}89$ min ermittelt werden; dieser relativ kleine Wert weist darauf hin, daß das Levkojen-Virus in der gleichen Zeiteinheit schneller inaktiviert wird als das TMV. In der Verdünnung 1 : 100 tritt dieser Unterschied noch deutlicher in Erscheinung, da hier der Regressionskoeffizient nur $b = 1{,}8$ min beträgt. Bei beiden geprüften Serien ergab die Berechnung des t-Wertes, daß der Kurvenverlauf auf einer echten, geradlinigen Zunahme der Zeit bei verminderten Temperaturen beruht; die Abhängigkeit der beiden Faktoren Temperatur und Zeit voneinander konnte durch das Bestimmtheitsmaß B statistisch gut gesichert werden. Die Verdünnung 1 : 100 zeigt zwar

bei den hohen und niedrigen Temperaturen stärkere Abweichungen von der Regressionslinie — die sich auch in den Sicherungswerten auswirken —, doch sind auch diese Ergebnisse bei einer Wahrscheinlichkeit von 5 % noch ausreichend gesichert. In Tabelle 7 sind die *t*-Werte sowie die Bestimmtheitsmaße bei den entsprechenden Freiheitsgraden zusammengestellt.

Tabelle 6

Hitze-Inaktivierungszeiten des Levkojen-Virus im Temperaturbereich von 65°C bis 20°C

Temperatur in °C	Inaktivierungszeiten (in min)			
	Unverdünnt		1 : 100	
	beobachtete	regressive	beobachtete	regressive
65°	1,66	4,75	4	19,7
60°	5,5	13,7	4	19,7
55°	55	39,7	32	35,3
50°	300	113,7	85	64,6
45°	780	327,6	130	112,8
40°	2 430	944,1	320	201,7
35°	5 100	2 720,4	410	360,5
30°	6 600	7 838,9	540	644,6
25°	9 300	22 585,4	1 020	1 152,5
20°	31 680	65 087	5 400	2 060

Tabelle 7

t-Werte und Bestimmtheitsmaße *B* für die Inaktivierungskurven des Levkojen-Virus

Verdünnung	Berechneter *t*-Wert	Tabellenwert von *t*	*B*	Sicherheitspunkte für *B*	FG
Unverdünnt	11,06	5,04 (P = 0,001)	0,937	0,761 (P = 0,001)	9
1:100	3,12	2,36 (P = 0,05)	0,581	0,444 (P = 0,05)	8

Im Verlauf dieser Kurven sind ähnliche Abweichungen von der Regressionsgraden zu erkennen (Abb. 11 u. 12), wie sie auf Seite 62 für das TMV beschrieben worden sind. Auch hier können diese Schwankungen auf eine unterschiedliche Temperaturempfindlichkeit verschiedener Bestandteile des Virusmoleküls zurückgeführt werden.

Die Berechnungen haben auch hier den Beweis erbracht, daß der Verlauf der thermalen Inaktivierungskurven des Levkojen-Virus eine Gerade darstellt und eine Gleichung ersten Grades den Charakter dieser Kurve bestimmt. Im Hinblick auf die Geradlinigkeit ist die Grundtendenz sowohl beim Levkojen-Virus wie beim TMV die gleiche; die Ergebnisse zeigen aber auch, daß beim Levkojen-Virus auf Grund hoher Temperaturempfindlichkeit und frühzeitiger Alterung hinsichtlich des Inaktivierungsverlaufs (Grad der Neigung der Kurven) andere Reaktionen auftreten.

3. Unterbrochene Erhitzung

Bei den niedrigen Temperaturen sind die langen Einwirkungszeiten sowohl im Hinblick auf die Bearbeitung wie auf die Pflanzen schwierig. RIPPEL-BALDES (59) hat bei Abtötungsversuchen an Bakterien darauf hingewiesen, daß „öfterer und schroffer Wechsel der Temperatur schädlicher ist als konstante Einwirkung". Wenn die Viren in ähnlicher Weise wie die Bakterien durch eine solche Behandlungsweise in kürzerer Frist abgetötet werden könnten, wäre für die praktische Wärmetherapie an den Pflanzen die Möglichkeit gegeben, ungünstige Nebenwirkungen durch die Unterbrechung der Behandlung wieder auszugleichen. KUNKEL (41) wendete bei der Bekämpfung von Pfirsichvirosen diese Methode an, um eine Schädigung der Pflanzenteile durch längere Erwärmung zu verhindern. Die Versuche waren jedoch erfolglos; es muß angenommen werden, daß die Temperatur von 35 °C zu niedrig war, um einen schroffen Wechsel herbeizuführen.

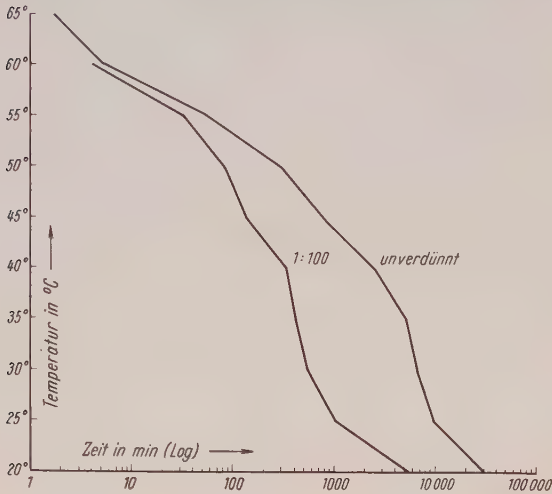


Abb. 11. Hitze-Inaktivierungskurven des Levkojen-Virus

In eigenen Versuchen konnte der Einfluß einer unterbrochenen Erhitzung auf die Inaktivierungszeit an dem TMV in vitro festgestellt werden. Bei einer andauernden Einwirkung von 90 °C war die Inaktivierung nach 30 min erreicht. Es wurden nun 4 Versuchsreihen angesetzt, in denen die mit virösem Preßsaft gefüllten Ampullen nach verschiedenen Einwirkungszeiten jeweils 1,5 min in Wasser abgekühlt wurden. In der ersten Serie wurden die Proben so lange abwechselnd 5 min erhitzt und wieder abgekühlt, bis der Verlust der Infektiosität eintrat. In den weiteren Se-

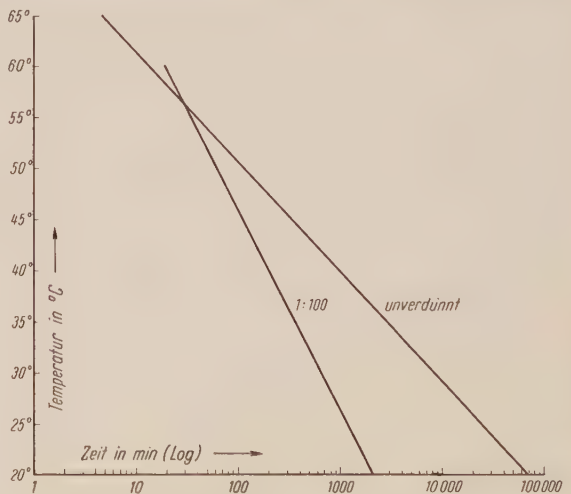


Abb. 12. Hitze-Inaktivierungskurven des Levkojen-Virus. Regressionslinien

rien betrugen die Einwirkungszeiten 3,5 min, 2 min und 1 min. Die Ergebnisse, die in der Tabelle 8 zusammengestellt sind, zeigen, daß eine unterbrochene Erhitzung die Gesamt-Einwirkungszeit beträchtlich vermindert. Es zeigt sich aber auch, daß dies nur erreicht werden kann, wenn eine optimale Einwirkungsdauer für den Einzelfall eingehalten wird.

Tabelle 8

Abkürzung der Inaktivierungszeit des TMV durch unterbrochene Erhitzung

Temperatur	Inaktivierungszeiten (in min) mit unterbrochener Einwirkung von je				Einwirkung ohne Unterbrechung
	5 min	3,5 min	2 min	1 min	
90°C	20 (4 × 5)	21 (6 × 3,5)	24 (12 × 2)	28 (28 × 1)	30
89°C	30 (6 × 5)	45,5 (13 × 3,5)	64 (32 × 2)	noch nicht nach 78	72

4. Abkürzung der Versuchsdauer

Die Hitze-Inaktivierung unverdünnter Virus-Preßsäfte bzw. von Viren hoher Konzentration durch niedrige Temperaturen kann — wie das Beispiel des TMV zeigt — sehr lange Einwirkungszeiten erfordern. Daher liegt es nahe, den Inaktivierungsverlauf für derartige Fälle wenigstens zunächst mit einem verdünnten Saft festzustellen und daraus theoretisch das Verhalten des unverdünnten bzw. wenig verdünnten Saftes abzuleiten. Die Zulässigkeit eines solchen Vorgehens bedarf allerdings der Nachprüfung. Daher wurde eine Versuchsreihe auf Grund folgender Überlegungen angesetzt:

Es ist hinreichend bewiesen, daß die Anzahl der Läsionen, die von einer Virusprobe auf einer spezifisch reagierenden Testpflanze erzeugt werden, ein Maßstab für die Viruskonzentration dieser Probe ist (Youden u. a., 73; Samuel und Bald, 62). Das bedeutet, daß zwei Proben ein und desselben Virus, die sich nur durch eine andere Verdünnung unterscheiden, trotzdem die gleiche Anzahl aktiver Partikeln besitzen müßten, wenn eine Infektion mit jeder Probe die gleiche Anzahl von Läsionen hervorruft. Im Hinblick auf die Versuchsdauer erhebt sich hier die Frage, ob es möglich ist, einen auf 1 : 100 verdünnten virushaltigen Preßsaft einem unverdünnten Saft aus derselben Pflanze, der nach Erhitzung die gleiche Läsionszahl wie die Verdünnung 1 : 100 aufweist, für die anschließende Beobachtung der thermalen Einwirkung gleichzusetzen.

In der betreffenden Versuchsreihe wurde also ein unverdünnter Preßsaft durch Wärmebehandlung auf den Wirkungsgrad einer Verdünnung 1 : 100 desselben Peßsaftes gebracht, wobei laufend festgestellte Veränderungen in den Läsionszahlen als Maßstab dienten. Sodann wurde für die beiden Preßsaft-Zubereitungen die Inaktivierungszeit bei der anschließenden bzw. fortgesetzten Wärmebehandlung — mit 90 °C und 80 °C — ermittelt; dabei ergaben sich die in Tabelle 9 wiedergegebenen Zeiten. Bis zur völligen Inakti-

vierung des Virus im unverdünnten Saft ist also bei gleichbleibender Temperatur eine erheblich längere Zeit beansprucht worden als für die Abtötung des Virus in der Verdünnung 1 : 100.

Tabelle 9

Zeitliche Inaktivierungsdifferenz zwischen zwei verschieden verdünnten Preßsäften gleicher Läsionszahl des TMV

Versuch Nr.	Grad der Verdünnung	Zahl der Läsionen	Temperatur	Inaktivierung nach	Differenz
1	Unverdünnt 1 : 100	90 ± 4 90	90°C	35 min 2 min	33 min
2	Unverdünnt 1 : 100	115 ± 6 115	80°C	4 Tagen 9 Stunden	3 Tg. 15 Std.

Danach ist es nicht angängig, die Inaktivierungskurve eines unverdünnten virushaltigen Preßsaftes auf Grund solcher Überlegungen theoretisch anzusetzen, um ihren weiteren Verlauf in kürzerer Zeit zu erfassen. Bei der Erörterung des Inaktivierungsvorganges wird diese Frage in anderem Zusammenhang noch einmal aufzugreifen sein (siehe S. 72).

5. Reaktivierung

Die Frage nach einer Reaktivierung von Virusmolekülen, die durch eine Wärmebehandlung bereits inaktiviert sind, hat für die praktische Anwendung der Wärmetherapie besondere Bedeutung. Da es gelungen ist, durch verschiedene Agentien meist chemischer Natur einen reversiblen Zustand der Inaktivierung herbeizuführen, war deshalb hier im besonderen zu prüfen, ob auch eine Erwärmung die Infektiosität nur zeitweise aufheben kann. STEARN (66), der sich vorwiegend mit enzymatischen Vorgängen befaßt hat, weist darauf hin, daß bei nicht zu rigoroser Erhitzung viele Wärmedenaturierungen — besonders im Temperaturbereich um 50 °C — reversibel sind.

Die eigenen Versuche wurden mit dem TMV und dem Levkojen-Virus durchgeführt. Im Hinblick auf praktische Verhältnisse wurde besonderer Wert darauf gelegt, die erforderliche Inaktivierungszeit nur wenig zu überschreiten, da man gerade bei praktischer Durchführung einer Wämebehandlung bestrebt sein wird, eine Pflanze bzw. einen Pflanzenteil nicht länger als unbedingt notwendig der thermalen Einwirkung auszusetzen. Bei dem verwendeten Stamm des TMV konnte die Hitze-Inaktivierungszeit bei einer Temperatur von 85 °C mit 22 h und 30 min festgelegt werden; anschließend wurden 21 Ampullen mit Preßsaft derselben Pflanze für eine Zeit von 22 h und 45 min bei dieser Temperatur erhitzt. Es war anzunehmen, daß die Partikeln nach dieser Zeit gerade inaktiviert waren; eine Probe, die sofort auf *Nicotiana glutinosa* getestet wurde, bestätigte diese Annahme. Die weiteren Proben wurden bei Zimmertemperatur unbedeckt aufbewahrt und jeweils eine Probe im Abstand von drei Tagen geprüft, so daß insgesamt eine Zeitspanne von 60 Tagen ge-

testet werden konnte. Bei allen Proben ergab sich ein negatives Resultat; danach hat eine Reaktivierung nicht stattgefunden.

Ein gleicher Versuch mit dem Levkojen-Virus bei 50 °C und einer Inaktivierungszeit von 285 min bestätigte diesen Befund; hier konnte belegt werden, daß auch bei längerem Abwarten nicht mit einer Reaktivierung zu rechnen ist. Aus den Ergebnissen dieser Versuche läßt sich ableiten, daß ein virushaltiger Preßsaft, der bei einer bestimmten Temperatur etwas länger als die erforderliche Inaktivierungszeit erhitzt wird, durch diese Behandlung die Fähigkeit zur Infektion für dauernd verliert.

D. Erörterung des Inaktivierungsvorganges

In der Einleitung wurde schon darauf hingewiesen, daß den Ergebnissen der Versuche, die zur Feststellung der Hitze-Inaktivierungszeit angesetzt wurden, zunächst theoretische Bedeutung zukommt; ob sie in der praktischen Virusbekämpfung angewendet werden können, müssen vergleichende Versuche bestätigen. Es lassen sich jedoch bereits Beispiele aus der Literatur anführen, die auf eine Übereinstimmung hindeuten.

1. Vergleiche mit Untersuchungen in vivo

Die bei Himbeeren auftretende viröse Stauche (*rubus* stunt) konnte in unabhängigen Versuchen bei verschiedenen Temperaturen geheilt werden: bei 46 °C in 195 min (Thung, 69) und bei 32 °C in 11 520 min (Chambers, 12). Werden diese beiden Punkte auf halblogarithmischem Papier aufgetragen und geradlinig verbunden, dann deckt sich diese Gerade annähernd mit denen, die in den eigenen Untersuchungen erhalten wurden. Auch bei den Versuchen von Kunkel (40), die Hexenbesenkrankheit der Kartoffel in *Vinca rosea* durch Wärme zu heilen, kann aus den angegebenen Werten (42 °C mit 4000 min und 36 °C mit 10 000 min) eine ähnliche Beziehung abgeleitet werden. In einer weiteren Arbeit gibt derselbe Autor (42) die Inaktivierungszeiten des Erregers der infektiösen Vergilbung der Aster (*aster yellows* virus) in Insekten an, die er bei 42 °C, 36 °C und 32 °C mit 1 Tag, 8 Tagen und 12 Tagen ermitteln konnte; es ergibt sich auch hier ein ähnlicher Verlauf, wenn diese Punkte aufgetragen und geradlinig verbunden werden. In Untersuchungen über den Einfluß einer Wärmebehandlung vermutet Kassanis (31), daß der Heileffekt in keiner Beziehung zu dem Hitze-Inaktivierungspunkt eines Virus in vitro zu stehen scheint; er leitet dies aus dem Tatbestand ab, daß mit dem Virus der Bronzefleckenkrankheit bzw. mit dem TMV infizierte Pflanzen typische Krankheitssymptome aufwiesen. Bei Pflanzen, die von Viren mit einem hohen Inaktivierungspunkt befallen waren, konnte dagegen unter den gleichen Bedingungen keine Symptomausbildung beobachtet werden. Kassanis vertritt die Ansicht, daß das Virus in der Pflanze bei 36 °C anscheinend inaktiviert, jedoch bei dieser Temperatur in vitro noch nicht verändert wird. Bei einigen der vermutlich geheilten Pflanzen traten unter normalen Wachs-

tumsbedingungen jedoch wieder Symptome vom Typ der inokulierten Viren auf. Diese Beobachtung berechtigt zu dem Einwand, den auch MULVANIA (49) ausspricht, daß die erhöhte Temperatur nur die Vermehrung des Virus unterdrückt und somit seinen gefährdenden Einfluß verhindert hat. KASSANIS selbst läßt die Frage offen, ob bei einer anderen Temperatur als 36 °C eine Heilung der mit dem Bronzeflecken-Virus infizierten Pflanzen nicht doch gelungen wäre.

Daher dürfte die Auffassung zutreffen, daß es für bestimmte Wirt-Virus-Kombinationen eine optimale Inaktivierungstemperatur bzw. -zeit gibt, die einmal von dem Wirt ohne wesentlichen Schaden ertragen wird, zum anderen aber einen sicheren „Abbau" des Erregerkomplexes herbeiführt. Diese Vermutung ist um so mehr berechtigt, als es bei der Gestaltung des Wirt-Erreger-Verhältnisses sowohl das Virus wie auch die Pflanze sind, die in gegenseitiger Beeinflussung und Wechselbeziehung den Verlauf der Krankheit bestimmen. Deshalb wird eine Übertragung theoretischer Erkenntnisse, die aus Untersuchungen nur eines dieser beiden wirkenden Teile gewonnen sind, auf praktische Verhältnisse zunächst nicht gerechtfertigt sein. Eine Virusinfektion kann immer als das Eindringen eines Fremdkörpers in eine Pflanze aufgefaßt werden, wodurch das dynamische Gleichgewicht in den Funktionen der Zellen mehr oder weniger gestört wird. Dieser Gesichtspunkt gewinnt besondere Bedeutung dadurch, daß bei einer gelungenen Wärmetherapie nur das Virusprotein zerstört wird und weitere Eiweißverbindungen der Zelle unverändert bleiben. Daher kann eine Pflanze normal weitergedeihen, wenn eine sachgemäße Wärmetherapie das Virusprotein abgetötet hat. Das Verhältnis Wirt-Virus bzw. Wirtseiweiß zu Viruseiweiß erscheint demnach von erheblicher Bedeutung für den Erfolg einer Wärmebehandlung zur Virusabtötung.

Diese Beeinflußbarkeit der Viren durch das Wirtsverhältnis ist aus den Erfahrungen mit der Virusübertragung durch Blattläuse bekannt. Hier werden persistente und nicht-persistente Viren nach der Erhaltung ihrer Infektionsfähigkeit im Insekt unterschieden. Diese Unterscheidung sucht man zu erklären aus der Größe der Virusmoleküle, von der es abhängt, ob ein Erreger durch die Darmwand zu diffundieren und so in die Blutbahn und die Speicheldrüse des Vektors zu gelangen vermag. Da ein und dasselbe Virus in verschiedenen Vektorinsekten sich hinsichtlich seiner Übertragungsfähigkeit völlig verschieden verhalten kann, muß es also neben der bloßen Durchgangsmöglichkeit noch bestimmte Bindungen physiologischer Art geben, die einem Vektor die Eigenschaften eines Dauerüberträgers nach einmaliger Aufnahme eines Virus verleihen. Selbst wenn Stoffwanderung und Stoffaustausch im Insekt ganz anders als in der Pflanze verlaufen, kann man doch annehmen, daß das Ausmaß der Krankheit einer Pflanze ebenfalls von einer relativ festen Vereinigung oder einer nur lockeren Verbindung zwischen Virusprotein und Zellbestandteilen beeinflußt wird. Diese Verhältnisse werden sich auch darauf auswirken, ob ein Virus in einem bestimmten Wirt durch eine Wärmebehandlung verhältnismäßig leicht zu bekämpfen ist, während in anderen Fällen eine solche Behandlung keinen Erfolg hat. Die unterschiedliche Hitzestabilität

des Virus allein kann also für den wechselnden Erfolg der Wärmetherapie nicht maßgeblich sein.

Ein weiterer Anhaltspunkt zur Deutung dieser unterschiedlichen Inaktivierungsraten ergibt sich aus dem Verlauf der Regressionslinien des TMV in den fünf geprüften, in Abbildung 10 aufgezeichneten Verdünnungsstufen. Bei den Serien „Unverdünnt“ und „1 : 2“ verlaufen die Geraden fast parallel und weisen eine nur geringe Neigung auf, in den Serien „1 : 100“ und „1 : 1000“ ist dagegen ein steilerer Abfall zu erkennen. Die Gerade der Verdünnung „1 : 10“ neigt zwar mehr zu den Serien höherer Verdünnung, doch läßt sich noch deutlich eine Zwischenstellung ablesen. Diese Unterschiede sind statistisch sehr gut gesichert und erlauben daher folgende Deutung:

Die Verhältnisse, welche durch die Geraden in den Serien „Unverdünnt“ und „1 : 2“ wiedergegeben sind, können auf Pflanzen bezogen werden, in denen das Virus sich stark vermehrt hat und somit eine relativ hohe Viruskonzentration vorliegt. Hier erfordert die Inaktivierung schon bei hohen Temperaturen eine lange Zeit, eine für eine lebende Pflanze noch erträgliche Temperatur würde noch länger einwirken müssen; eine Heilung der Pflanze durch Wärme erscheint in solchem Falle kaum erreichbar. Die Geraden in den Serien höherer Verdünnung entsprechen dagegen einem nur geringen Vermehrungsgrad eines Virus in einer Pflanze; unter diesen Bedingungen ist das Virus schneller angreifbar und wird also leichter zu bekämpfen sein.

Im Hinblick auf diese Zusammenhänge kann verständlich werden, weshalb das Levkojen-Virus in der gleichen Zeiteinheit schneller inaktiviert wird als das TMV. Es hat sich offenbar in nicht so hoher Konzentration in der Pflanze anreichern können wie jenes Virus.

2. Progressive Erniedrigung des Hitze-Inaktivierungspunktes

Beim Vergleich zweier Verdünnungsstufen des TMV ergibt sich weiterhin, daß die Lage des Hitze-Inaktivierungspunktes mit Verlängerung der Einwirkungsdauer einer bestimmten Temperatur graduell verändert werden kann.

Mc Kinney (48) sowie Uppal (70) stellten fest, daß beim TMV eine Verdünnung auf 1 : 1000 den Hitze-Inaktivierungspunkt um 6 °C erniedrigt (Testzeit 10 min) und schlossen daraus, daß entweder eine höhere Temperaturempfindlichkeit der stärker verteilten Partikeln vorliege oder der Pflanzensaft verändert worden sei. Die Beobachtungen zweier anderer Autoren deuten darauf hin, daß die Ursache dieser Erniedrigung auf eine Abnahme der Viruskonzentration zurückzuführen ist: Fulton (16) inaktivierte das Virus in Preßsäften aus den oberen Blättern und aus den Wurzeln mosaikkranker Tabakpflanzen und fand, daß zur Inaktivierung des Virus im Preßsaft aus den Blättern eine um 8 °C höhere Temperatur erforderlich war. Aus einer Arbeit von Mc Kinney (47) geht nun hervor, daß die in Viruseinheiten gemessene Konzentration in den oberen Pflanzenteilen allgemein um ein Drittel höher ist als in den unteren Abschnitten. Die stärkere Verteilung der Viruspartikeln könnte damit als wesentliche Voraussetzung für die erhöhte Tempe-

raturempfindlichkeit eines Virus und der damit verbundenen Erniedrigung des Hitze-Inaktivierungspunktes gelten.

Alle bisherigen Untersuchungen über die Veränderung des Hitze-Inaktivierungspunktes durch Verdünnungen halten an der definitionsgemäßen Einwirkungszeit von 10 min fest. Es konnte daraus geschlossen werden, daß z. B. eine Erniedrigung von 5 °C zwischen den Serien „Unverdünnt" und „1 : 1000" auch nach einer längeren Einwirkungszeit noch die gleiche Differenz betragen müßte. Diese Annahme kann jedoch nicht aufrechterhalten werden; die eigenen Untersuchungen führten vielmehr zu dem Ergebnis, daß bei Verdünnungen, die eine wesentliche Veränderung in der Viruskonzentration hervorrufen, in keinem Falle ein Gleichbleiben der ursprünglichen Temperaturdifferenz zu beobachten war. Die Tabelle 10 enthält die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

Tabelle 10

Progressive Erniedrigung des Hitze-Inaktivierungspunktes beim TMV

Einwirkungsdauer in min	Erniedrigung des Hitze-Inaktivierungspunktes (in °C) beim Vergleich zwischen			
	Unverdünnt / 1 : 2	Unverdünnt / 1 : 10	Unverdünnt / 1 : 100	Unverdünnt / 1 : 1000
1	1	4	5	5
10	2	3,5	5	6
100	1	3	5,5	9,5
1 000	0,5	4,5	8,5	21
10 000	2,5	6	14	19
100 000	1,5	11,5	18	19

Daraus geht hervor, daß bei kurzen Einwirkungszeiten (= hohen Temperaturen) der Hitze-Inaktivierungspunkt nur wenig gesenkt wird; je länger jedoch die Einwirkungszeit (= niedrige Temperaturen), umso größer wird die Temperaturdifferenz. So beträgt der Unterschied zwischen den Serien „Unverdünnt" und „1 : 1000" bei 1 min = 5 °C, während nach 100 000 min eine um 14 °C höhere Differenz festgestellt werden konnte. Die graphische Kurvendarstellung (Abb. 10) und rechnerische Erfassung des Inaktivierungsverlaufs deuten demnach auf verschiedene Veränderungen des Virus bei diesem Vorgang hin. Aus der dargelegten progressiven Erniedrigung des Hitze-Inaktivierungspunktes ist herzuleiten, daß der Grad der Verdünnung des Virus — und damit eine höhere Temperaturempfindlichkeit der stärker verteilten Partikeln — nicht der dabei allein wirksame Faktor sein kann.

Eine weitere Ursache für die aufgetretenen Unterschiede könnte darin bestehen, daß die Partikeln im unverdünnten Saft die Fähigkeit zu einer teilweisen „Rekonstruierung" besitzen. Diese wird so verstanden, daß nur leicht angegriffene Virusmoleküle durch chemische Affinität bestimmte Wirkgruppen von bereits im Zerfall befindlichen Partikeln anlagern; ein Vorgang, der ohne eine Veränderung dieser Wirkgruppen — also schnell — erfolgen könnte, da sie ja bereits Teile eines Virusproteins waren. In einer höheren

Verdünnung wäre diese Möglichkeit nicht mehr gegeben, da die Partikeln sich sehr vereinzelt im Dispersionsmittel befinden und die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens zur Vereinigung geeigneter Bruchstücke also sehr klein ist.

Zweifellos enthält ein viröser Pflanzensaft bei erhöhter Temperatur verschiedene Denaturierungszustände der Virusmoleküle, wobei die Inaktivierung als eine Vorstufe der Denaturierung angesehen wird. Daher weist ein solcher Saft nahe dem Inaktivierungspunkt nur noch wenige infektiöse Einheiten auf. Man nimmt an, daß die Denaturierung auf einem Zerfall der Virusmoleküle in zwei Komponenten — Nukleinsäure und Eiweißkomplex — beruht, wobei der Nukleinsäure neben ihrer Bedeutung für den Vermehrungsvorgang hinsichtlich der Infektiosität die biologische Wirksamkeit zukommt. Untersuchungen darüber sind besonders von MARKHAM & SMITH (45) durchgeführt worden. Sie konnten beim Gelbmosaik-Virus der Wasserrübe eine aktive Form mit Nukleinsäure und eine inaktive ohne Nukleinsäuregehalt isolieren. LAUFFER u. a. (43) haben nachgewiesen, daß die Partikeln des TMV bei einer Hitzebehandlung mit dem Verlust der Nukleinsäure in ein inaktives Stadium überführt werden. MARKHAM & SMITH betrachten ein aktives Teilchen als einen Nukleinsäurekern, der von einer Glocke aus Protein umhüllt ist. Eine etwaige „Rekonstruierung" einer Viruspartikel wäre unter Berücksichtigung der von BAWDEN (4) beschriebenen Inaktivierungszustände demnach so vorstellbar:

Solange die Inaktivierung reversibel bleibt, ist besonders der Proteinkomplex angegriffen, die Bindungen zum Nukleinsäurekern sind gelockert; der Kern selbst bleibt zum größten Teil unverändert. Wird der inaktivierende Zustand aufgehoben, dann erholt sich der Proteinkomplex wieder und gelockerte Bindungen können wieder gefestigt werden. Hier könnte die oben angedeutete Ergänzung aus Teilen schon stärker angegriffener Partikeln eintreten.

Bei dem scheinbar irreversiblen Zustand der Inaktivierung sind der Proteinkomplex und weiterhin auch der Nukleinsäurekern stark verändert; bestimmte Bindungen in der Kernstruktur — und damit die Infektionsfähigkeit — sind aufgehoben. Da der gesamte Komplex jedoch noch lose zusammenhält, bleiben die serologische Aktivität und die physikalischen Eigenschaften erhalten.

Bei der Denaturierung erfolgt ein Zerfall des gesamten Komplexes, der nach Ausflockung homologer Teile nicht mehr in der Lage ist, sich wieder zu verbinden. Damit sind alle nachweisbaren Eigenschaften eines Virusmoleküls verlorengegangen.

In ähnlicher Weise hat auch POLLARD (53) den Aufbau einer Viruspartikel gedeutet und die verschieden feste Verknüpfung zwischen Nukleinsäure und Protein auf drei Kettenbindungen zurückgeführt. Im Hinblick auf die praktische Wärmetherapie erscheint es denkbar, daß jeder dieser drei Inaktivierungszustände des Virus in der Pflanze im Verlauf der Wärmebehandlung eingetreten sein kann und daß der tatsächliche Erfolg vom Eintritt der letzten Zustände abhängig ist. Da in den auf Seite 66 dargestellten Versuchen eine

neue Infektion mit wärmebehandelten Preßsäften oder Verdünnungen in keinem Falle gelungen ist, besteht demnach bei einer sachgemäßen Wärmebehandlung nicht die Gefahr, daß eine geheilte Pflanze bzw. ein Pflanzenteil durch eine allmähliche Reaktivierung bereits inaktiver Partikeln erneut erkrankt. Damit ist jedoch keine Immunisierung des behandelten Pflanzenmaterials verbunden; Kunkel (40) hat dies besonders betont und den möglichen Wechsel zwischen Heilung und Reinfektion an einer Pflanze durch seine Untersuchungen bewiesen.

Mit der Annahme einer „Rekonstruierung" könnte auch erklärt werden, daß die beim Versuch auf Seite 66 erörterte Gleichsetzung von Virus und Virusverdünnung auf Grund augenblicklicher Übereinstimmung der Läsionszahlen nicht angeht. Das dort festgestellte unterschiedliche Verhalten bei der anschließenden bzw. fortgesetzten Wärmebehandlung könnte in der „Rekonstruierung" des Virus im unverdünnten Saft begründet.

E. Merkmalsumbildung durch Wärmebehandlung

Mit der Möglichkeit, die Erreger pflanzlicher Viruskrankheiten durch eine thermale Behandlung sowohl in vitro als auch in vivo inaktivieren und damit eine Heilung infizierter Pflanzen und Pflanzenteile erzielen zu können, kann als bedenkliche Begleiterscheinung die Auslösung von Merkmalsumbildungen („Mutationen") verbunden sein. Die weitgehende Spezialisierung vieler Virusarten läßt ihre Neigung offenbar werden, bei einer Veränderung der Faktoren, unter deren Einfluß sie sich als homogen erweisen, abweichende Varianten auszubilden. Solche Beobachtungen konnten besonders bei dem X-Virus der Kartoffel (Köhler, 36) und beim TMV (Jensen, 25) gemacht werden. Auf Grund dieser Feststellung sowie der von den Verff. des Sorauer (65) geäußerten Vermutung, daß „das Ergebnis u. U. durch die selektive Wirkung der Behandlung oder — bei Passagen — des Substrates zustande gekommen sein kann", dürfte die Auffassung zutreffen, daß ein Virusstamm nicht als homogene Einheit angesehen, sondern als ein Gemisch von Komponenten mit verschiedener biologischer Wirksamkeit gedeutet werden kann. Bawden (5) sagt darüber: „In der Tat haben wir keinen Grund zu glauben, daß irgendein Viruspräparat hergestellt worden ist, in dem alle Bestandteile gleiche chemische Zusammensetzung, gleiche biologische Eigenschaften und gleiche Größe haben". Wird also ein Virusstamm als ein solches Gemisch von einzelnen Linien aufgefaßt, dann kann der Begriff „Merkmalsumbildung" die Verhältnisse weit besser charakterisieren als die Verwendung des Begriffs „Mutation" im genetischen Sinne, da es sich in den meisten Fällen offenbar lediglich um eine Entmischung handelt. Ein schönes Beispiel dafür bieten die Untersuchungen von Johnson (28), in denen er durch Passage über Sumpf-Edeldistel *(Eryngium aquaticum)* die Umbildung eines auf *Nicotiana tabacum* virulenten Stammes in einen avirulenten feststellen konnte.

Unter den Faktoren, die eine Förderung der Merkmalsumbildung bewirken können, sind neben der o. a. Passage über nichtkongeniale Wirte

Röntgenbestrahlung, Licht und Wärme zu nennen. Im Hinblick auf die praktische Anwendung der Wärmetherapie besteht also die Gefahr, daß durch diese Behandlung das Auftreten neuer Varianten begünstigt wird. Gäumann (17) sowie auch Köhler (35) betonen, daß solche „sprunghaften Konstitutionsänderungen" bei der Erhitzung virushaltiger Preßsäfte nahe dem Inaktivierungspunkt erfolgen, in Pflanzen jedoch schon bei wesentlich niedrigeren Temperaturen eintreten. Dies konnte Holmes (22) bestätigen, als er nach Erwärmung des TMV und vergleichenden Prüfungen zwei Varianten feststellte, die sich in taxonomisch wichtigen Merkmalen von der Ausgangsform unterschieden. Durch die Untersuchungen von Kassanis (31) ist weiterhin bewiesen, daß so entstandene Varianten sehr labil sind und bei erneuter Erhitzung leichter zu Umbildungen neigen als ursprüngliche Stämme.

Zweifellos ist das Auftreten von Varianten unter natürlichen Verhältnissen sehr groß; es ist wahrscheinlich, daß sich auch die Symptome verändern oder bisher nicht befallene Pflanzen für einen dieser Stämme empfänglich sind. Dies berechtigt zu der Annahme, daß viele spontan aufgetretene Viruskrankheiten lediglich durch Varianten bereits bekannter Viren hervorgerufen werden. Wenn es gelänge, einen in wesentlichen Merkmalen konstant bleibenden Typ eines Virus als Artmittelpunkt festzuhalten, um den irgenwann entstandene — und immer noch entstehende — Varianten streuen können, dann dürfte auch den taxonomischen Verhältnissen ein Teil ihrer Problematik genommen und damit der Artenreichtum bei den Erregern der pflanzlichen Viruskrankheiten um einen guten Teil vermindert sein.

Die Andeutung dieser grundsätzlichen Probleme bei der Taxonomie und der Klassifizierung der virösen Erreger sei abgeschlossen mit einer Feststellung aus einem Bericht von Bawden (5): „Nun sind neue Pflanzenviren mit beinahe erschreckender Häufigkeit beschrieben worden; viele von ihnen haben zweifellos lange vorher existiert, aber sie waren nicht erkannt worden; bei einigen ist es aber sehr wahrscheinlich, daß sie neueren Ursprungs sind. Trotzdem brauchen diese Viren nicht neu zu sein; als Bestandteile anderer Arten, bei denen sie keine Symptome hervorrufen, können sie älter sein, nur daß sie erst in den letzten Jahren auf Pflanzen übertragen worden sind, in denen ihre pathogenen Neigungen offenbar wurden.

Die neuesten Versuche ergaben, daß die Variationen in Größe, Gestalt, Beschaffenheit und biologischem Verhalten verschiedener Partikeln des Tabakmosaik-Virus größer sein können, als wir vor 10 Jahren vermutet haben würden".

Zusammenfassung

1. Die bedrohliche Verbreitung wirtschaftlich bedeutsamer Viruskrankheiten erfordert eine verstärkte Bekämpfung ihrer Erreger. Neben den gebräuchlichen Sanierungsmaßnahmen kommt einer thermalen Behandlung im Hinblick auf die relativ hohe Temperatur-

empfindlichkeit der Viren besondere Bedeutung für die Heilung viruskranker Pflanzen bzw. Pflanzenteile zu.

2. Untersuchungen über die allgemeinen Voraussetzungen für eine Wärmetherapie wurden an zwei Pflanzenviren (TMV; Levkojen-Virus) in vitro durchgeführt, die sich besonders in der Inaktivierungstemperatur und der Alterungsbeständigkeit unterscheiden.

   Die Erhitzung frischen, unbehandelten Preßsaftes erfolgte im Wasserbad, dabei hat sich die Verwendung von verschmolzenen Ampullen als sehr zweckmäßig erwiesen. Für die Prüfung der Infektiosität standen spezifisch reagierende Testpflanzen zur Verfügung.

3. An Hand von über 1500 Erhitzungen einzelner Virusproben und den Testergebnissen von fast 8000 infizierten Pflanzen konnte die Wirkung einer thermalen Behandlung in Beziehung zur Inaktivierungszeit bei verschiedenen Verdünnungen beobachtet werden.

4. Eingehende statistische Berechnungen haben den Beweis erbracht, daß der Verlauf der thermalen Inaktivierungskurven bei beiden geprüften Viren eine Gerade darstellt und somit nach einer Gleichung ersten Grades bestimmt werden kann.

   Gleichmäßige Abweichungen in den einzelnen Verdünnungsstufen von den entsprechenden Regressionsgeraden werden auf eine unterschiedliche Temperaturempfindlichkeit verschiedener Komponenten der Viruspartikeln zurückgeführt.

5. Der Einfluß einer unterbrochenen Erhitzung wirkt sich dahingehend aus, daß die Gesamt-Inaktivierungszeit bei Einhaltung einer optimalen wiederholten Einwirkungsdauer beträchtlich abgekürzt werden kann.

6. Werden zwei verschieden verdünnte Proben desselben Virus auf die gleiche Läsionszahl (Maßstab für die biologische Aktivität) gebracht, so verhalten sich beide Proben bei einer anschließenden gleichen Wärmebehandlung hinsichtlich der Infektiosität insofern völlig verschieden, als für die Inaktivierung des Virus im unverdünnten Saft eine bedeutend längere Zeit erforderlich ist. Demnach gibt ein solcher biologischer Test keinen zuverlässigen Ausgangspunkt für die Bemessung der Inaktivierungszeiten bei niedrigen Temperaturen.

7. Vergleichende Betrachtungen der Inaktivierungskurven in den einzelnen Verdünnungsstufen ergeben, daß die Lage des Hitze-Inaktivierungspunktes sowohl mit zunehmender Einwirkungszeit wie mit Abnahme der Viruskonzentration einer progressiven Erniedrigung unterliegt. Dieser Vorgang, wie die Ergebnisse in Punkt 6, werden auf eine „Rekonstruierung“ geschädigter Virusmoleküle im unverdünnten Saft zurückgeführt.

8. Eine Reaktivierung durch Wärme bereits inaktivierter Partikeln war nicht festzustellen; danach besteht bei praktischen Heilungsversuchen nicht die Gefahr einer „spontanen“ Wiedererkrankung.
   Eine Immunisierung erfolgt durch Wärmebehandlung nicht, so daß Neu- bzw. Reinfektionen zu jeder Zeit wieder möglich sind.
9. Vergleiche mit den Ergebnissen praktischer Heilungsversuche ergaben keine befriedigende Übereinstimmung mit dem Verlauf der eigenen Inaktivierungskurve, da zu wenig Material vorliegt, das für eine graphische Erfassung geeignet ist.
10. Eine thermale Behandlung kann sich nachwirkend in der Auslösung von Merkmalsumbildungen des Virus bemerkbar machen; dies wird dann um so mehr zu erwarten sein, wenn die Inaktivierungstemperatur des Virus nicht erreicht worden ist. Die Probleme bei den taxonomischen Verhältnissen sowie der Klassifizierung werden angedeutet und daraus Rückschlüsse auf die Schwierigkeiten bei der Artabgrenzung der Erreger pflanzlicher Viruskrankheiten gezogen.

Literaturverzeichnis

1. Allard, H. A., 1917: Further studies of the mosaic disease of tobacco. J. Agr. Res. 10, 615—632.
2. Arthur, J. M., and J. M. Newell, 1929: The killing of plant tissue and the inactivation of tobacco-mosaic virus by ultra-violet light. Amer. J. Bot. **16**, 338—353.
3. Bartels, W., 1955: Der gegenwärtige Stand der Forschung auf dem Gebiet der Inaktivierung pflanzenpathogener Viren, insbesondere des Tabakmosaikvirus. Phytopath. Z. **2**, 117—118.
4. Bawden, F. C., 1950: Plant virus and virus diseases. Waltham, Mass. USA, 3. Aufl. 243.
5. — —, 1947: Some implications and limitations of recent work on plant viruses. IV. Int. Congr. Microbiol. Kopenhagen. Rep. Proc. Rosenkilde u. Bagger, Kopenhagen 1949.
6. — —, B. Kassanis und H. L. Nixon, 1950: The mechanical transmission and some properties of potato paracrincle virus. J. Gen. Microbiol. **4**, 210—219.
7. Bennet, C. W., 1939: The nomenclature of plant viruses. Phytopathology **29**, 422 bis 430.
8. Bigelow, W. D., 1921: The logarithmic nature of thermal death time curves. J. Infect. Dis. **29**, 528—536.
9. Blodgett, F. M., 1923: Time temperature curves for killing potato tubers by heat treatments. Phytopathology **13**, 466—475.
10.* Bovey, R., 1954: La chaleur, moyen de lutte contre les maladies à virus des plantes. Rev. romande Agr. Vitic. **10**, 65 (Ref.: Hort. Abstr. **24**, 3601, 1954).
11.* Boyer, C. A., D. F. Lovitt und D. Cation, 1950: A report on certification of stone fruit nursery stock in Michigan. Lansing, Michigan Dep. Agr., 23 S. (Ref.: Rev. appl. Myc. **30**, 329, 1951).
12. Chambers, J., 1954: Heat therapy of virus-infected raspberries. Nature **173**, 595—596.
13. Fajardo, T. G., 1930: Studies on the properties of the bean-mosaic virus. Phytopathology **20**, 883—888.

14. Fulton, J. P., 1954: Heat treatment of virus-infected strawberry plants. Plant Dis. Rpt. **38**, 147—149.

15. Fulton, R. H., 1954: Studies on inactivation of the strawberry type 2 virus in vivo. Phytopathology **44**, 489 (Abstr.).

16. Fulton, R. W., 1941: The behaviour of certain viruses in plant roots. Phytopathology **31**, 575—598.

17. Gäumann, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. Birkhäuser, Basel. 2. umgearb. Aufl. 294.

18. Grainger, J., and G. Cockerham, 1930: Some properties of the virus extract of dock mosaic. Proc. Leeds Phil. Soc. **2** (III), 120—124.

19. Hoggan, J. A., 1933: Some viruses affecting spinach and certain aspects of insect transmission. Phytopathology **23**, 446—474.

20. Holmes, F. O., 1939: Proposal for extension of the binomial system of nomenclature to include viruses. Phytopathology **29**, 431—436.

21. — —, 1954: Preventive and curative effects of thiouracil treatments in mosaic-hypersensitive tobacco. Phytopathology **44**, 492 (Abstr.).

22. — —, 1934: A masked strain of tobacco mosaic virus. Phytopathology **24**, 845—873.

23.* Houtman, P. W., 1925: Warmwaterbehandeling van zeefvatenziekte DI **52** bibit, in het groot toegepast. Arch. Suik. Ned. Ind. **XXXIII**, 27, 631—642 (Ref.: Rev. appl. Myc. **V**, S. 4, 1926).

24. Hutchins, L. M., and J. L. Rue, 1939: Promising results of heat treatments for inactivation of phony disease virus in dormant nursery peach trees. Phytopathology **29**, 12 (Abstr.).

25. Jensen, J. H., 1936: Studies on the origin of yellow mosaic viruses. Phytopathology **26**, 266—277.

26. Johnson, J., 1922: The relation of air temperature to the mosaic disease of potatoes and other plants. Phytopathology **12**, 438—440.

27.* — —, 1927: The classification of plant viruses. Wisconsin Agr. Exp. Stat. Res. Bull. **76** (Ref.: Rev. appl. Myc. **VI**, 501, 1927).

28. — —, 1947: Virus attenuation and the separation of strains by specific hosts. Phytopathology **37**, 822—837.

29. — —, and J. A. Hoggan, 1935: A descriptive key for plant viruses. Phytopathology **25**, 328—343.

30. Kassanis, B., 1950: Heat inactivation of leaf roll virus in potato tubers. Ann. appl. Biol. **37**, 339—341.

31. — —, 1954: Heat therapy of virus-infected plants. Ann. appl. Biol. **41**, 470—474.

32. — —, 1949: Potato tubers freed from leaf roll virus by heat. Nature **164**, 881.

33. King, N. J., 1953: A cause of varietal decline. Sug. J. **16**, 24—29.

34. Köhler, E., 1937: Über ein „veinbanding"-Virus der Kartoffel. Phytopath. Z. **10**, 17—29.

35. — —, 1937: Über eine äußerst labile Linie des X-Mosaikvirus der Kartoffel. Phytopath. Z. **10**, 467—479.

36. — —, 1941: Über die Variabilität und Mutabilität pflanzenpathogener Virusarten, dargestellt am Kartoffel-X-Virus und am Tabakmosaikvirus. Biol. Zbl. **61**, 298 bis 308.

37. Knust, H. G., 1953: Notes on the heat treatment of cane plants at the Bundaberg Sugar Experiment Station. Cane Grs. quart. Bull. **17**, 33—36 (Hort. Abstr. **23**, 4691, 1953).

38. Koller, S., 1953: Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen. Steinkopff, Darmstadt, 3. Aufl. 73 S.

39. — —, 1940: Allgemeine statistische Methoden im speziellen Hinblick auf die menschliche Erblehre. Handb. d. Erbbiol. d. Mensch. Springer-Verlag, Bd. **II**, 112—208.

40. Kunkel, L. O., 1943: Potato witches broom transmission by dodder and cure by heat. Proc. Amer. Phil. Soc. **86**, 470—475.

41. — —, 1936: Heat treatments for the cure of yellows and other virus diseases of peach. Phytopathology **26**, 809—830.

42. — —, 1941: Heat cure of aster yellows in periwinkles. Amer. J. Bot. **28**, 761—769.

43. Lauffer, M. A., W. C. Price and A. W. Petre, 1949: The nature of viruses. Adv. Enzymol. **9**, 171—240.

44. Linder, A., 1951: Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. Birkhäuser, Basel, 238 S.

45. Markham, R., and K. M. Smith, 1949: Studies on the virus of turnip yellow mosaic. Parasitology **39**, 330.

46.* Martin, J. P., 1933: Pathology. Ann. Rpt. Exp. Stat. Proc. Hawaii. Sug. Pl. Ass. 23—42 (Ref.: Rev. appl. Myc. **XII**, 722, 1933).

47. McKinney, H. H., 1927: Quantitative and purification methods in virus studies. J. Agr. Res. **35**, 13—18.

48. — —, 1927: Factors affecting certain properties of a mosaic virus. J. Agr. Res. **35**, 1—12.

49. Mulvania, M., 1926: Studies on the nature of the virus of tobacco mosaic. Phytopathology **16**, 853—871.

50. Nichols, C. W., and G. Nyland, 1952: Hot water treatments of some stone fruit viruses. Phytopathology **42**, 517 (Abstr.).

51. Norris, D., 1953: Reconstitution of virus-X-saturated potato varieties with malachite green. Nature **172**, 816.

52. Pfeil, E., und W. Kannengiesser, 1952: Untersuchungen zur Therapie pflanzlicher Virosen. Jber. Biol. Bundesanst. Braunschweig **50**.

53. Pollard, E. C., 1953: The physics of viruses. New York, 104.

54. Posnette, A. F., 1953: Heat inactivation of strawberry viruses. Nature **171**, 312.

55. — —, R. Cropley and C. E. Ellenberger, 1953: Progress in the heat treatment for strawberry virus diseases. East Mall. Res. Stat. **3**, 128—130, 1952/53.

56. Pound, G. S., and J. C. Walker, 1945: Differentiation of certain crucifer viruses by the use of temperature and host immunity reaction. J. Agr. Res. **71**, 255—278.

57. Price, W. C., 1935: The thermal death rate of tobacco-mosaic virus. Phytopathology **25**, 749—769.

58. Reddick, D., and V. B. Steward, 1919: Transmission of the virus of bean mosaic in seed and observations on the thermal death point of seed and virus. Phytopathology **9**, 445—450.

59. Rippel-Baldes, A., 1947: Grundriß der Mikrobiologie. Springer-Verlag, 133.

60. Ryshkow, W. L., 1952: Die Systematik der Viren in der modernen Literatur. Mikrobiologie **4**, 21, 458—476 (Übersetzung).

61. Salzmann, R., 1948: Aktuelle Fragen im schweizerischen Kartoffelbau. Schweiz. Landw. Mh. **4**, 28 S.

62. Samuel, G., and J. G. Bald, 1933: On the use of the primary lesions in quantitative work with two plant viruses. Ann. appl. Biol. **20**, 70—99.

63. Smith, K. M., 1937: A textbook of plant virus diseases. Philadel.

64. Snedecor, G. W., 1950: Statistical methods. Ames, Iowa, 4. Aufl.

65. Sorauer, P., 1954: Viruskrankheiten. In: Handb. Pflanzenkrankh. Bd. **II**, 6. Aufl., 1. Liefg., 97.

66. Stearn, A. E., 1945: Kinetics of biological reactions with special reference to enzym processes. Adv. Enzym. **9**, 25—74.

67. STODDARD, E. M., 1942: Inactivation of the virus of X-disease of peach by chemotherapy. Phytopathology **32**, 17 (Abstr.).

68. THIRUMALACHAR, M. J., 1954: Inactivation of potato leaf roll by high temperature storage of seed tubers in Indian plains. Phytopath. Z. **22**, 429—436.

69. THUNG, T. H., 1952: Warnemingen omtrent de dwergziekte bij framboos en wilde braam. T. Plantenz. **58**, 255—259.

70. UPPAL, B. N., 1934: The effect of dilution on the thermal death rate of tobacco-mosaic virus. Ind. J. Agr. Sc. **4**, 874—879.

71. USCHDRAWEIT, H. A., 1952: Die Bedeutung des Tabakmosaik-Virus und des Kartoffel-X-Virus für den Tomatenbau. Angew. Bot. **XXVI**, 3/4, 118—129.

72. WILBRINK, G., 1923: Warmwaterbehandeling van stekken als geneesmiddel tegen de serehziekte van het suikerriet. Arch. Suik. Ned. Ind., Med. Proefst. Java Suikerind. **31**, 1—15.

73. YOUDEN, W. J., H. P. BEALE and J. D. GUTHRIE, 1935: Relation of virus concentration to the number of lesions produced. Contr. Boyce Thomps. Inst. **7**, 37—52.

Die mit * gekennzeichneten Arbeiten lagen nur als Referate vor.

Aus der Zweigstelle Rosenhof des Max-Planck-Institutes für Züchtungsforschung, Ladenburg (Neckar)
Leiter: Prof. Dr. E. Knapp

Über die Anfälligkeit der *Beta*-Arten für das Rübenmosaikvirus nach mechanischer Inokulation[1])

Von

Ruth Marx

Während in der Gattung *Beta* sich bisher alle Arten für das Vergilbungsvirus anfällig zeigten (Schlösser 1952, Bennett und Costa 1954, Hijner und Rietberg 1955), scheinen im Verhalten gegenüber dem Rübenmosaikvirus (RMV) größere Unterschiede vorhanden zu sein. Neben *B. maritima* gelten *B. patellaris* (Bennett 1949) und *B. procumbens* (Christova 1950) als anfällig, *B. lomatogona* als weniger anfällig (Margara 1953) und *B. trigyna* als immun (Kovács 1953).

Die Zuckerrübe ist — ebenso wie die anderen Kulturrüben (*B. vulgaris*) — für das RMV anfällig und wird in ihrer Leistung (Zucker- und besonders Samenertrag) beeinträchtigt. Es wäre daher für die Züchtung von Interesse, wenn unter den Wildarten widerstandsfähige Formen gefunden würden, deren Resistenz durch Kreuzung auf die Zuckerrübe übertragen werden könnte.

Zur Prüfung ihrer Anfälligkeit für das RMV wurden im Sommer 1956 (z. T. auch im Sommer 1955 und im Winter 1956/57) acht Arten verschiedener Herkunft untersucht:

Sektion *Vulgares*

B. maritima (1. Herkunft Bot. Garten Delft, erhalten von Herrn Prof. Dr. Dr. O. Heinisch, Leipzig),

B. maritima (2. Herkunft Bot. Garten Lissabon, ebenfalls von Herrn Prof. Heinisch),

B. maritima (3. Herkunft Irland, erhalten von Herrn Dr. B. Crombie, Mallow, Irland, auf dem Rosenhof frei abgeblüht und mit Kulturrübe bastardiert),

1) Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

B. patula (4. Herkunft, aus Madeira stammend, erhalten von Herrn Ir. H. Rietberg, Bergen op Zoom, Niederlande),

B. macrocarpa (5. Herkunft Algerien und Tunesien, erhalten von Frl. Dr. L. Stange, Köln).

Sektion *Corollinae*

B. lomatogona (6. Herkunft Türkei, erhalten von Herrn Dr. Afif Gediz, Eskisehir, Türkei),

B. trigyna (7. Herkunft, wie 6.).

Sektion *Patellares*

B. patellaris (8. Herkunft, von der marokkanischen Küste bei Agadir stammend, erhalten von Herrn Ir. H. Rietberg, Bergen op Zoom, Niederlande),

B. patellaris (9. Herkunft, erhalten von Herrn Dr. J. Margara, Versailles, Frankreich, aus Material von Herrn Dr. D. Stewart, Beltsville, Md., USA, stammend),

B. procumbens (10. Herkunft, ursprünglich von den Kanarischen Inseln stammend, erhalten von Herrn Dr. G. H. Coons, Beltsville, Md., USA),

B. webbiana (11. Herkunft, wie 10.)[2]).

Methodik

Die Versuche wurden im Gewächshaus durchgeführt. Von *B. lomatogona* und *B. trigyna* standen jedoch nur Freilandpflanzen zur Verfügung. Das RMV (Isolat „Rosenhof") wurde mechanisch durch Einreiben des Preßsaftes mosaikkranker Zuckerrübenblätter unter Verwendung von Karborund übertragen. Von allen Arten wurden zur Sicherung der Befunde Rückinfektionen auf Zuckerrüben vorgenommen. Zum Nachweis einer Primärinfektion wurden die inokulierten Blätter, zum Nachweis einer sekundären (systemischen) Infektion deren Achselsprosse oder jüngere, nicht-inokulierte Blätter zu Brei zerrieben, der als Inokulum für die Zuckerrüben diente.

Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengefaßt.

Aus der Sektion *Vulgares* zeigten *B. patula* und *B. maritima* normale Mosaiksymptome wie die Zuckerrübe mit Adernaufhellung als Frühsymptom und charakteristischen Mosaikflecken an den Blättern. Deutliche Primärsymptome waren nicht festzustellen. Bastarde aus *B. maritima* × *B. vulgaris*

---

[2]) Für die Überlassung von Saatgut sei an dieser Stelle bestens gedankt.

reagierten auf die gleiche Weise. Rückinfektionen auf Zuckerrüben unter Verwendung von inokulierten und nicht-inokulierten Blättern waren positiv. Außerdem gelangen Infektionen und Rückinfektionen sehr leicht und ohne besondere Behandlung der Pflanzen. Die übereinstimmende Reaktion der drei Arten erklärt sich aus ihrer nahen Verwandtschaft.

Reaktion verschiedener *Beta*-Arten auf das Rübenmosaikvirus nach mechanischer Inokulation

Sektion	Art	Infektion		Symptome	
		primär	systemisch	primär Lokalläsionen	sekundär Mosaikflecke
Vulgares	*B. vulgaris* (Zuckerrübe)	+	+	—	+
	B. maritima	+	+	—	+
	B. maritima × *B. vulgaris*	+	+	—	+
	B. patula	+	+	—	+
	B. macrocarpa	+	+	+	—[1])
Corollinae	*B. lomatogona*	—	—	—	—
	B. trigyna	—	—	—	—
Patellares	*B. patellaris*	+	—	+	—
	B. procumbens	+	+	+	—[2])
	B. webbiana	+	+	?	—

[1]) Blattdeformation, Totalnekrose

[2]) Feine Rotfleckung

Etwas abweichend verhielt sich eine andere Art der Sektion *Vulgares*, *B. macrocarpa*. Bei dieser bildeten sich während des Sommers auf den inokulierten Blättern Lokalläsionen in Form kleiner nekrotischer Flecke, an den übrigen Blättern waren keine Symptome zu sehen. Positive Rückinfektionen waren nur von den inokulierten Blättern zu erhalten. Bei Pflanzen, die während des Winters in einem frühen Stadium ihrer Entwicklung (6- bis 8-Blattstadium) nach 24stündiger Verdunklung infiziert worden waren, konnte auch eine systemische Erkrankung nachgewiesen werden. Dabei waren außer Lokalläsionen an den inokulierten Blättern Mißbildungen an den nach der Infektion gebildeten Blättern zu beobachten, jedoch keine Mosaikflecke. Das Wachstum war stark gehemmt, und nach vier bis sechs Wochen waren die Pflanzen abgestorben. Bei keiner der anderen untersuchten *Beta*-Arten war eine so starke Schädigung aufgetreten, die schließlich zur Totalnekrose geführt hätte. Es ist wahrscheinlich, daß für den Grad der Anfälligkeit das Alter der Pflanze zum Zeitpunkt der Infektion und die Lichtverhältnisse von Bedeutung sind. Da z. B. bei der Zuckerrübe die Suszeptibilität erhöht ist, wenn die Pflanzen vor der Inokulation bei verminderter Beleuchtungsstärke gehalten werden (unveröffentl. Versuche), kann für die größere Anfälligkeit von

B. macrocarpa im Winter dieselbe Ursache angenommen werden (vgl. auch *B. procumbens* und *B. webbiana*). *B. patula* und *B. macrocarpa* sind bisher als Wirtspflanzen des RMV nicht bekannt gewesen.

B. lomatogona und *B. trigyna* aus der Sektion *Corollinae* wiesen keinerlei Symptome auf (Freilandpflanzen). Rückinfektionen mit inokulierten und nicht-inokulierten Blättern waren negativ. Auch Pflanzen, die seit vier Jahren im Garten des Rosenhofes in unmittelbarer Nachbarschaft mosaik- und vergilbungskranker Zuckerrüben stehen und Infektionen durch Blattläuse ausgesetzt waren, zeigten keine Mosaik-, wohl aber Vergilbungssymptome, und ergaben bei mechanischer und bei Blattlausübertragung bezüglich des RMV nur negative Rückinfektionen. Daraus kann geschlossen werden, daß beide Arten mit großer Wahrscheinlichkeit für das RMV nicht anfällig sind. Dies deckt sich mit den Befunden von KOVÁCS (1953), nach denen *B. trigyna* immun ist, und für *B. lomatogona* gibt MARGARA (1953) „moindre sensibilité apparente aux maladies à virus (mosaïque et jaunisse)“ an.

In der Sektion *Patellares* traten bei *B. patellaris* keine Sekundärsymptome auf, auch nicht an ganz jungen Pflanzen und nach vorhergehender Verdunklung. Nur an den inokulierten Blättern entstanden Lokalläsionen als rote Flecke, die allmählich nekrotisch wurden. Rückinfektionen mit ganzen inokulierten Blättern und ausgestanzten Nekrosen waren positiv, mit nicht-inokulierten Blättern oder mit Achselsprossen inokulierter Blätter dagegen negativ. Es ist darauf hinzuweisen, daß für die vorliegenden Untersuchungen *B. patellaris*-Herkünfte mit 2 n = 36 Chromosomen Verwendung fanden. Nach BENNETT (1949) kann die Infektion bei Blattlausübertragung auf einzelne Zweige beschränkt bleiben oder die ganze Pflanze erfassen. SCHNEIDER und MUNDRY (1956) erhielten auch nach mechanischer Inokulation eine systemische Infektion (sie verwendeten *B. patellaris* mit 2 n = 18 Chromosomen). Die mangelnde Übereinstimmung der Befunde kann außer durch Abweichungen in der Methode und den Versuchsbedingungen auch durch genetische Unterschiede des Materials (z. B. Chromosomenzahl) bedingt sein. Mit solchen Unterschieden kann auch bei jeder der übrigen Arten, besonders bei verschiedener geographischer Herkunft, gerechnet werden.

Bei *B. procumbens* und *B. webbiana* waren im Sommer keine Anzeichen einer Infektion festzustellen, alle Rückinfektionen waren negativ. Im Winter zeigte *B. procumbens* nach Verdunklung vor der Inokulation an den inokulierten Blättern Lokalläsionen und bei systemischer Infektion an den übrigen Blättern zahlreiche feine rote Tupfen, aber keine Mosaikflecke. Rückinfektionen waren mit allen Blättern positiv. Bei *B. webbiana* war im Winter ebenfalls eine systemische Infektion nachweisbar, ohne daß jedoch Symptome vorhanden waren; an den inokulierten Blättern traten nur undeutliche Symptome (Lokalläsionen?) auf, Rückinfektionen waren positiv. *B. webbiana* war bisher als Träger des RMV nicht genannt worden. Der Befund, daß bei

allen untersuchten *Patellares*-Arten die mechanische Inokulation schwieriger war als bei den *Vulgares* und häufig mißlang, läßt darauf schließen, daß eine gewisse Resistenz vorhanden ist.

Zusammenfassung

Acht Wildarten aus drei Sektionen der Gattung *Beta* wurden auf ihr Verhalten gegenüber dem Rübenmosaikvirus nach mechanischer Inokulation im Gewächshaus untersucht (*Corollinae:* nur Freilandpflanzen). Der Nachweis des Virus erfolgte durch Rückinfektion auf Zuckerrüben.

Die einzelnen Arten reagierten verschieden, jedoch war innerhalb der Sektionen eine gewisse Übereinstimmung festzustellen.

Sektion *Vulgares.* Systemische Infektion mit charakteristischen Mosaiksymptomen (Adernaufhellung als Frühsymptom, Mosaikflecke) wie bei der Zuckerrübe *(B. vulgaris)* wurde bei *B. maritima* und *B. patula* sowie bei Bastarden aus *B. maritima* × *B. vulgaris* erhalten, ausgeprägte Primärsymptome wurden nicht beobachtet. *B. macrocarpa* zeigte Lokalläsionen und bei systemischer Erkrankung Blattdeformationen, starke Wachstumshemmung und Totalnekrose, aber keine Adernaufhellung und Mosaikfleckung.

Sektion *Corollinae.* Bei *B. lomatogona* und *B. trigyna* war keine Infektion nachweisbar. Beide Arten können demnach als resistent gelten.

Sektion *Patellares. B. patellaris* (36-chromosomig) bildete Lokalläsionen, eine systemische Infektion kam nicht zustande. Bei *B. procumbens* traten Lokalläsionen und als Symptom der systemischen Erkrankung eine feine Rotfleckung auf, jedoch kein typisches Mosaik. *B. webbiana* entwickelte bei systemischer Infektion keine Symptome; Primärsymptome (Lokalläsionen?) waren nur undeutlich. Alle *Patellares*-Arten waren schwer zu infizieren und können als teilresistent angesprochen werden.

B. patula, B. macrocarpa und *B. webbiana* waren bisher als Wirtspflanzen des Rübenmosaikvirus nicht beschrieben worden.

Literaturverzeichnis

Bennett, C. W., 1949: Some unreported host plants of sugar beet mosaic virus. Phytopathology **39**, 669—672.

— —, and A. S. Costa, 1954: Observation and studies of virus yellows of sugar beet in California. Proc. Amer. Soc. Sugar Beet Techn. **8**, Part 1, 230—235.

Christova, E., 1950: Mozaikata po Svekloto v Bulgaria (Beet mosaic in Bulgaria). Rev. Inst. Rech. sci. Minist. Agric., Sofia, **18**, 1, 89—100. (Zitiert nach M. Drachovská-Šimanová: Řepné Virosy a Jejich Přenašeči, Prag 1955; Ref. in Rev. appl. Mycol. **29**, 486—487, 1950.)

Hijner, J. A., et H. Rietberg, 1955: La selection sur tolerance contre la jaunisse est-elle possible? 18e Congr. I. I. R. B., Brüssel, 8e Communication. 4 S.

Kovács, A., 1953: Adatok a répamozaik biológiájához (Data on the biology of beet mosaic). Ann. Inst. Protect. Plant., Budapest, **VI**, 1951, 213—223.

Margara, J., 1953: Sur l'obtention d' un hybride amphidiploïde entre *Beta vulgaris* L. et *Beta lomatogona* F. et M. C. R. Acad. Sci. **237**, 836—838.

Schlösser, L.-A., 1952: Zur Frage der Wanderung europäischer Rübenvirosen. Phytopath. Z. **20**, 75—82.

Schneider, F., und K.-W. Mundry, 1956: Die elektronenmikroskopische Darstellung des Mosaikvirus der Zuckerrüben. Z. Naturforschg. **11 b**, 393—394.

Aus dem Phytopathologischen Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. M. Klinkowski

Sechsjährige Beobachtungen über die physiologische Spezialisierung des echten Mehltaus (*Erysiphe graminis* DC.) von Weizen und Gerste in Deutschland

Von

I. Nover

Einleitung

Der echte Mehltau des Getreides, *Erysiphe graminis* De Candolle, hat eine weltweite Verbreitung. Da er nur relativ geringe Ansprüche an Temperatur und Luftfeuchtigkeit stellt, ist er in kontinentalen Klimalagen ebenso beheimatet wie in maritimen. Der optimale Temperaturbereich für Keimung der Sporen, Infektion und Myzelwachstum liegt zwischen 12—20 °C. Kurzfristige Einwirkungen von Temperaturen über 30 °C und unter 0 °C vermindern zwar die Vitalität der Konidien, töten sie jedoch nicht. Einmal ausgebildete Myzelrasen auf lebendem Wirtsgewebe ertragen Temperaturschwankungen des Makroklimas in noch weiteren Grenzen.

Der hohe Wassergehalt der Konidien, der nach Yarwood (1950) 75 % ihres Frischgewichtes betragen soll, erklärt u. a., daß der Pilz auch bei Trokkenheit zu keimen vermag. Nach eigenen Erfahrungen werden jedoch die Keimung der Konidien und Ascosporen wie auch ihre Infektionsfähigkeit eindeutig durch hohe Luftfeuchtigkeit begünstigt. Es steht damit nur scheinbar in Widerspruch, daß Trockenperioden den Befall fördern. Unter solchen Bedingungen fruktifiziert der Pilz stärker und die Konidien reifen schneller heran. Sie finden auf Blättern durch Taubildung oder Transpiration zeitweise genügend Feuchtigkeit. Die Keimung beginnt unter optimalen Bedingungen sehr schnell; sie ist schon nach einer Stunde sichtbar.

Die wirtschaftliche Bedeutung des durch den Parasiten hervorgerufenen Schadens an Weizen und Gerste kann erheblich sein. Eine Bekämpfung mit chemischen Mitteln ist aus Rentabilitätsgründen untragbar. Deshalb ist sie eine wichtige Aufgabe der Resistenzzüchtung, an deren Lösung seit Jahren mit Erfolg gearbeitet wird. Voraussetzung dafür sind Kenntnisse über Vorkommen und Verbreitung von Rassen unterschiedlicher Pathogenität. In Deutschland schuf Honecker (1937, 1938) in Weihenstephan für den Gerstenmehltau die Grundlagen. Entsprechende Untersuchungen am Erreger des Weizenmehltaus begannen in Halle 1936 auf Anregung und mit Unterstützung von Roemer (Schlichting 1938, Nover 1941/42). Sie wurden 1939 vorzeitig unterbrochen und erst im Jahre 1950 erneut aufgegriffen. Es erschien notwendig, sie auf den Gerstenmehltau auszudehnen, denn der in Mitteldeutschland auf den Weihenstephaner resistenten Sommergersten verschiedentlich aufgetretene Befall ließ Veränderungen in der Rassenpopulation des Pilzes vermuten. Der derzeitige Stand der Arbeiten nach sechsjährigen Beobachtungen über die physiologische Spezialisierung der Erreger *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* und f. sp. *hordei* und die Verbreitung ihrer Rassen in den einzelnen Jahren soll hier dargelegt werden.

1. Arbeitsmethoden

a) Infektion

Es werden junge, kräftig entwickelte Pflanzen infiziert. Die zahlreich gebildeten Konidien, welche auch unter natürlichen Verhältnissen der Massenvermehrung des Pilzes dienen, werden in trockener Form oder als wäßrige Suspension auf die Pflanze gebracht. Die Keimung der Sporen und das Haften der Infektion wird durch hohe Luftfeuchtigkeit und Einhalten von Temperaturen im günstigen Bereich (12—20 °C) gewährleistet. Im einzelnen entwickelt sich der Arbeitsgang aus den jeweiligen Gegebenheiten. Dabei ist entscheidend, wieviel Infektionsmaterial zur Verfügung steht; ob es einheitlich ist oder ob mit getrennten Rassen räumlich und zeitlich zugleich gearbeitet wird; ob die Umweltfaktoren weitgehend regulierbar sind, wie bei Versuchen im Gewächshaus, oder ob bei Freilandversuchen die Witterungsverhältnisse berücksichtigt werden müssen.

Bei uns haben sich für die Infektion im Gewächshaus folgende Methoden als zweckmäßig erwiesen: das erste ausgewachsene Blatt der Keimpflanze wird infiziert; diese ist dann 10—14 Tage alt, sie schiebt gerade das zweite Blatt heraus. Ist die Menge des Infektionsmaterials gering, z. B. bei eingesandten Herkünften oder erstmaliger Vermehrung von Einsporlinien, so wird der Mehltau mit dem Skalpell abgenommen und direkt auf das mit feuchten Fingern sanft abgeriebene erste Blatt gestrichen. Stehen stark befallene Pflanzen zur Verfügung, werden die Konidien in ein schwarz glasiertes Porzellanschälchen vorsichtig abgeschüttelt und als wäßrige Suspension mit einem Haarpinsel übertragen (Honecker 1937, Nover 1941/42). Gegen den dunklen Grund der Schale läßt sich die Menge der hellen Sporen

ungefähr abschätzen. Bei diesem Verfahren ist die Gefahr der Vermischung verschiedener Rassen geringer als bei Infektion mit trockenen Sporen. Das Aufschwemmen beeinträchtigt jedoch die Keimung der Konidien. Über derartige Beobachtungen und Vermutungen zu ihrer ursächlichen Deutung liegen zahlreiche Mitteilungen vor (Graf-Marin 1934, Nover l. c., Domsch 1954, Allen 1955 u. a.).

Wenn jede Herkunft oder Rasse des Erregers in einem isolierten Raum gehalten werden kann, so daß eine Fremdinfektion ausgeschlossen ist, wird mit Sporen gestäubt. Die zu prüfenden Pflanzenserien werden zuerst mit Wasser besprüht, dann streicht man mit etwa 10 Tage vorher infizierten, gut fruktifizierenden Pflanzen einer anfälligen Sorte unter leichtem Schütteln darüber hinweg. Die Töpfe mit den befallenen Pflanzen der Vermehrungssorte können zwischen diejenigen der Versuchsserie gestellt und das Besprühen mit Wasser und anschließende Bestäuben mit Konidien kann an den folgenden Tagen wiederholt werden (Nover l. c.).

b) Bewertung des Befalls

Zehn Tage nach der Infektion wird der Mehltaubefall bonitiert. Bei einer durchschnittlichen Temperatur von 18—20 °C ist er auf anfälligen Wirten zwar schon drei Tage vorher sicher zu bestimmen, auf weniger anfälligen ist aber der Resistenztyp häufig erst nach zehn Tagen deutlich zu erkennen. Die Zahlenskala von 0 (resistent) bis 4 (sehr stark anfällig) mit den intermediären Abstufungen dient zur Bonitur des Befalls. Durch die Abkürzungen C (große Chlorosen), c (kleinere, begrenzte chlorotische Flecke), cc (nadelstichähnliche chlorotische Tüpfel) bzw. N, n oder nn für nekrotische Blattverfärbungen wird der Befallstyp näher gekennzeichnet. Während Gersten meist mit Blattverfärbungen reagieren, die das Charakterisieren des sortentypischen Befallsbildes erleichtern, sind diese Erscheinungen bei Weizen seltener. Auf Weizensorten mäßiger Resistenz entwickelt sich der Pilz dann mehr oder weniger schwach und fruktifiziert spärlich, ohne daß auf dem Wirt Zeichen einer „Abwehrreaktion" sichtbar werden. Den Befall solcher Sorten zu bewerten, erfordert einige Erfahrung.

2. Spezialisierung von *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Marchal

Mains wies als erster eine physiologische Spezialisierung innerhalb der formae speciales *tritici* und *hordei* nach. Er beschrieb 1933 zwei Weizenmehltau-Rassen in den USA: Gegen Rasse 1 war die Sorte Norka C. I. 4377 hochresistent, für Rasse 2 jedoch hochanfällig (Mains 1933). Eine Reihe anderer Sorten, darunter Huron C. I. 3315 und Chul C. I. 2227, wurden von keiner der beiden Rassen befallen. Bei Vergleich von drei in Kanada isolierten Rassen mit den beiden genannten (Tab. 1) hatte es den Anschein, als ob sie sich in ihrem Befall auf der Sorte Huron voneinander unterschieden (Newton und Cherewick 1947).

Tabelle 1

Befallstyp von fünf physiologischen Rassen von *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* auf Keimpflanzen von vier Testsorten (nach NEWTON und CHEREWICK 1947)

Testsorte	Rasse				
	1	2	3	4	5
Axminster R. L. 75	0	4	0	0	4
Norka R. L. 1888	0	4	0	0	4
Chul R. L. 543	0	0	4	0	0
Huron R. L. 20	?	?	4	4	4
Huron C. I. 3315	0	0	?	?	?

Sehr wahrscheinlich ist aber die in Kanada verwendete Sorte Huron R. L. 20 mit Huron C. I. 3315 nicht identisch. Die letzte erwies sich in Halle während der Jahre 1936—1938 als guter Differentialwirt, der gegen die meisten Pilzherkünfte 1937 resistent und nur für drei von ihnen anfällig war. Dagegen wurde R. L. 20, den wir 1952 vermittelt bekamen, von allen Rassen und Herkünften unterschiedslos stark befallen. Läßt man die fragliche Sorte in Tabelle 1 unberücksichtigt, so ist auf den drei ersten Testsorten das Befallsbild der Rasse „4" gleich dem der Rasse 1 (USA), und Rasse „5" gleicht Rasse 2 (USA). Rasse 3 (Kanada) ist dagegen besonders gekennzeichnet durch ihren Befall auf Chul. Unsere Beobachtungen werden bestätigt durch die Infektionsergebnisse von TAYLOR, RODENHISER und BAYLES (1949), denen Huron C. I. 3315 und Huron R. L. 20 gleichzeitig zur Verfügung standen. Sie stellten in Maryland (USA) drei Rassen fest. Diese, sowie zwei weitere von PUGSLEY und CARTER (1953) für Australien beschriebene Rassen und die Rasse S. A. 1, mit der GORTER (1955) in Transvaal (Südafrika) arbeitete, lassen sich mit den Rassen in Tabelle 1 vergleichen (Tab. 2).

Betrachtet man das Verhalten der fünf Testsorten gegen die ausländischen Rassen, so ist zu erkennen, daß Axminster und Norka stets übereinstimmend reagieren. Aus dieser Zusammenstellung gehen fünf Rassengruppen hervor (Tab. 2, letzte Spalte). In die Gruppe I gehören die Rasse 1 (USA) und die in den USA von der Sorte Purplestraw isolierte Rasse. Rasse P-1 (Australien) muß entweder dieser Gruppe oder der Rassengruppe IV zugeordnet werden. Nur ihr Befallsbild auf der Sorte Hope kann darüber entscheiden; es ist jedoch nicht in der Literatur beschrieben. In die Rassengruppe II ist hier nur Rasse 2 (USA) zu stellen. Die in den USA von der Sorte Axminster isolierte Rasse gleicht ihr zwar im Verhalten auf den drei ersten Testsorten, unterscheidet sich aber deutlich durch den starken Befall auf der Sorte Huron. Dadurch ist sie als Vertreter einer eigenen Gruppe (V) gekennzeichnet. Die Rassen P (Australien) und S. A. 1 (Südafrika) sind einander ähnlich. Sie lassen sich als Gruppe III auf Grund ihrer Aggressivität für die Sorte Chul von den anderen Rassengruppen differenzieren. Die

Rasse 3 (Kanada) ist nicht mit Sicherheit einzuordnen, weil die Sorte Huron R. L. 20 infiziert wurde. Drei in Südamerika festgestellte Weizenmehltau-Rassen konnten nicht zum Vergleich in Tabelle 2 herangezogen werden. Die Arbeit von Vallega und Cenoz (1941) lag uns bei Abschluß dieser Veröffentlichung noch nicht im Original vor. Aus einem Referat war lediglich bekannt, daß alle drei Rassen die Sorte Axminster nicht befallen, sie demnach nicht in die Gruppe II und V gehören. Die Sorten Chul und Sonora dienen zur Differenzierung der Rassen untereinander.

Tabelle 2

In Australien, Nordamerika und Südafrika beschriebene Rassen von *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*

(r = resistent, a = anfällig, ± = intermediär)

Rasse	Testsorte					
	Axminster C. I. 8195 = R. L. 75	Norka C. I. 4377 = R. L. 1888	Chul C. I. 2227 = R. L. 543	Huron C. I. 3315	Hope C. I. 8178 =(?) R.L. 209	Rassen-gruppe
1 (USA)[1]	r	r	r	r	r	I
von Purplestraw (USA)[3]	r	r	r	r	r	
P—1 (Australien)[4]	r	r	r	r		
von Hardired (USA)[3]	r	r	r	r	a	IV
P (Australien)[4]	r	r	a	r		III
S.A. 1 (Südafrika)[5]	r	r	a	r		
3 (Kanada)[2]	r	r	a			
2 (USA)[1]	a	a	r	r	r	II
von Axminster (USA)[3]	a	a	r	a	±	V

[1]) Mains 1933.
[2]) Newton und Cherewick 1947.
[3]) Taylor, Rodenhiser und Bayles 1949.
[4]) Pugsley und Carter 1953.
[5]) Gorter 1955.

a) Testsortiment

Bei der Aufstellung eines Testsortiments für die eigenen Untersuchungen fanden möglichst die genannten (Tab. 1 und 2), im Ausland üblichen Differentialwirte Berücksichtigung. Zusätzlich wurden einige Sorten ausgewählt, die sich nach unseren früheren Beobachtungen geeignet erwiesen hatten. Zur Zeit werden in Halle folgende Testssorten verwendet:

1. eine für alle Rassen stark anfällige Sorte als Indikator oder Infektionskontrolle, wie z. B.

Kraffts Dickkopf	Winter-W.	*aestivum*
Carsten V	Winter-W.	*aestivum*

2.

Salzmünde Stamm 14/44	Winter-W. aus Weizen × Roggen	*aestivum*

3.

Red Fern	Sommer-W.	*aestivum*
Ulka C. I. 11 478	Sommer-W.	*aestivum*
Saumur	Sommer-W.	*aestivum*

4. Axminster C.I. 8195	Sommer-W.	*aestivum*
Norka C. I. 4377	Sommer-W.	*aestivum*
Tu 4	Sommer-W.	*aestivum*
Pika	Sommer-W.	*aestivum*
5. Normandie	Sommer-W.	*aestivum*
6. Halle Stamm 13 471	Sommer-W. aus *aestivum* × *durum* (Griechischer Weizen 3)	*aestivum*
7. Weihenstephan Stamm M 1	Sommer-W. aus *aestivum* × *carthlicum*	*aestivum*
Schwarzer Persischer	Sommer-W.	*carthlicum*

Nr. 2, Salzmünde 14/44, ist ein durch Roggenpassage gegangener Stamm, den Riebesel entwickelte. Er ist keine ideale Testsorte, da er auf Mehltauinfektion nicht mit der erwünschten Alternative „resistent" oder „hochanfällig" reagiert, sondern häufig mit Zwischenstufen, die um einen Bonitierungsgrad variieren. Offensichtlich ist der Befall auf dieser Sorte Umweltfaktoren gegenüber zu labil, doch kann man vorläufig nicht auf sie verzichten.

Die unter Nr. 3 angeführten Testsorten verhalten sich gleichartig gegen die verschiedenen Rassen. Red Fern wurde von Mains (1933) als nicht anfällig für die Mehltaurassen 1 (USA) und 2 (USA) beschrieben. Durch seine freundliche Vermittlung erhielten wir 1936 Saatgut der von ihm verwendeten Sorten. Schon bei den damaligen Mehltau-Herkunftsprüfungen stimmten die Bonituren dieser Sorte mit denen des französischen Sommerweizens Saumur aus dem Sortiment Halle überein (Nover 1941/42). Die Sorte Ulka C. I. 11 478, ursprünglich aus Rußland, wurde später von Lowther (1950) erwähnt; sie diente ihm neben vier anderen Sorten zur Differenzierung von neun während der Jahre 1948/49 in USA isolierten Rassen. Näheres darüber wurde von ihm bisher nicht veröffentlicht. Die genetische Konstitution dieser Sorte wird von Pugsley und Carter (1953) mit den Symbolen ml_t Ml_u ml_s gekennzeichnet. Unter Nr. 4 sind vier Sommerweizen zusammengestellt, die wieder wahlweise als Testsorten verwendet werden können, weil sie auf die zehn in Halle isolierten Rassen von *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* übereinstimmend reagieren. Für die kanadischen Sorten Axminster C. I. 8195 und Norka C. I. 4377 kann diese Aussage auf die im Ausland beschriebenen Rassen des Erregers erweitert werden (vgl. Tab. 2). Nach Pugsley und Carter (l. c.) besitzen beide die genetische Konstitution Ml_t ml_u ml_s. Die zwei anderen hier genannten Sorten wurden dem Sommerweizensortiment Halle entnommen: Tu 4 ist ein österreichischer Landweizen; die Sorte Pika wurde von der Pflanzenzuchtstation Tammisto aus der Kreuzung zweier finnischer Landweizen entwickelt.

Nr. 5, Normandie, ist ein französischer Sommerweizen von Vilmorin, der schon viele Jahre im Sortiment Halle geführt wird. Roemer (1941/42) hat ihn wegen seiner Resistenz gegen eine größere Anzahl der in Deutschland

vorkommenden Rassen von *Erysiphe graminis, Puccinia glumarum* und *P. triticina* als Kreuzungselter empfohlen, obwohl er begrannt und wenig standfest ist. Mehltauresistenz vererbt diese Sorte dominant. Für die F_2 einer Kreuzung mit einem anfälligen Zuchtstamm ergab sich nach künstlicher Infektion eine Aufspaltung von 3714 resistenten : 582 anfälligen Individuen. Das Verhältnis 6,38 : 1 besagt, daß die Resistenz offensichtlich durch mehr als einen Faktor bedingt ist (NOVER 1941/42). PUGSLEY und CARTER (1953) fanden eine Aufspaltung von 15 : 1 in Kreuzungen mit der anfälligen Sorte Federation und geben für Normandie die Symbolisierung Ml_t Ml_u ? ml_s an.

Nr. 6 ist ein älterer hallescher Zuchtstamm, in den die Resistenz von der Sorte Griechischer Weizen 3 (*durum*) eingelagert wurde. Lezterer hat sich in den früheren Arbeiten dadurch ausgezeichnet, daß er von 50 Herkünften des Jahres 1937 praktisch nicht befallen und von einer einzigen stark befallen wurde (NOVER l. c.). Da der *durum*-Elter später nicht mehr im Sortiment vorhanden war, wurde sein *aestivum*-Nachkomme, der Stamm 13 371, als Ersatz genommen.

Die unter Nr. 7 aufgeführten Sommerweizen sind zur Zeit noch keine eigentlichen Differentialwirte. Sie sind für alle bis jetzt in Halle isolierten Weizenmehltau-Rassen hochresistent und werden als Fangsorten zum Erfassen neu auftretender aggressiver Rassen des Erregers stets mit geprüft. Über die Mehltau-„Immunität" des „Persischen Weizens" liegen zahlreiche ältere Angaben in der Literatur vor (vgl. NOVER l. c.). Der im Sortiment Halle geführte *T. carthlicum*, Schwarzer Persischer, wurde 1936/37 mehrfach in bewährte Winterweizenzuchtstämme eingekreuzt. Etwa zur gleichen Zeit wurde auch in Weihenstephan der erste Schritt zu der Kreuzung Koga × [Lichti früh × (Lichti früh × Schwarzer Persischer)] getan, aus der der Stamm M 1 hervorgegangen ist (WELLER und LECHNER 1953 S. 43). Nach unseren Beobachtungen besitzt er die Resistenz des *carthlicum*-Elters. Nur in einem einzigen Falle wurde er bei uns von einer Herkunft schwach befallen. Es gelang aber nicht, diese Herkunft auf der Sorte M 1 längere Zeit zu erhalten. Doch ist in Bayern eine Rasse aufgetreten, die den Stamm M 1 stärker befällt.

Als wertvoller Differentialwirt wurde schon die Sorte Chul C. I. 2227, ein *aestivum*-Sommerweizen, angeführt. Sie wäre für einen Vergleich der deutschen mit den ausländischen Weizenmehltau-Rassen notwendig. Sie ging uns 1953 durch Anbaufehler verloren, ebenso auch der Sommerweizen Hope, der sich in früheren Untersuchungen in Halle und erneut in Beltsville, USA, (TAYLOR, RODENHISER, BAYLES 1949) als geeignete Testsorte erwiesen hat.

b) Physiologische Rassen

Mit Hilfe des siebengliedrigen Testsortiments ließen sich aus 240 Konidien-Herkünften von *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*, die in den Jahren 1950 bis 1955 gesammelt wurden, 10 Rassen unterschiedlicher Pathogenität isolieren. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über ihr Verhalten auf unseren Testsorten.

Bei resistenzzüchterischen Untersuchungen in Halle (SCHLICHTING 1938) und Müncheberg bei Berlin (von ROSENSTIEL 1938) waren erste Hinweise auf

das Vorkommen mehrerer physiologischer Rassen des Erregers auch in Deutschland gewonnen worden. Da die Autoren zum Teil mit anderen Differentialwirten und zumeist mit Erregerpopulationen gearbeitet haben, lassen sich die damaligen Mehltauherkünfte unterschiedlicher Virulenz nur in einigen Fällen mit den heute gekennzeichneten Rassen identifizieren. Letztere sind deshalb neu durchnumeriert mit den Zahlen 1 bis 10. Zu einem eingehenderen Vergleich mit den ausländischen Rassen in Tabelle 2 fehlen die Bonituren auf den Sorten Chul, Huron und Hope. Die Rassen 1 und 2 gehören in eine Gruppe, welche die geringste Aggressivität zeigt. Sie unterscheiden sich lediglich auf dem Stamm Salzmünde 14/44. Vermutlich sind sie den Rassengruppen I oder III in Tabelle 2 nahestehend.

Tabelle 3

Befallstyp von zehn physiologischen Rassen von *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* auf Keimpflanzen von sieben Testsorten im Gewächshaus

Testsorte	Rasse									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 Carsten V (Kontrolle)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
2 Salzmünde 14/44	0—2	4	0—1	4	0–2	3	0—1	0–1	4	4
3 Red Fern, Ulka C. I. 11478	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4
4 Axminster C. I. 8195, Norka C. I. 4377	0	0	4	4	0	4	4	4	4	4
5 Normandie	0	0	0–1	0	0	0	4	4	4	4
6 Halle 13471	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3
7 Weihenstephan M 1, Schwarz. Persischer	0–1	0—1	0	0	0—1	0—1	0—1	0—1	0	0

Die Rassen 3 und 4, wieder auf Stamm 14/44 zu differenzieren, lassen sich in eine Gruppe mit mäßiger Aggressivität zusammenfassen. In ihren Wirtspflanzenkreis sind Sorten wie Axminster, Norka, Tu 4 und Pika einbezogen. Darin gleichen sie den Rassengruppen II oder V der Tabelle 2. Auch Rasse 5 ist mäßig aggressiv. Sie ist von den beiden vorhergehenden Rassen durch ihren starken Befall der Sorten Red Fern, Ulka und Saumur deutlich verschieden. Dagegen fehlt ihr das Befallsvermögen für Axminster und gleichartig reagierende Sorten. Über Rasse 6 zu den Rassen 7 und 9 nimmt die Aggressivität weiter zu. Die Rassen 7 und 9 haben auf unseren Testsorten übereinstimmende Befallsbilder mit Ausnahme desjenigen auf Stamm Salzmünde 14/44. Das gilt auch für die Rassen 8 und 10, für die, zum Unterschied gegen Rassen 7 und 9, sogar Stamm Halle 13 471 anfällig ist. STRAND (1954), dem die Arbeitsergebnisse und Testssorten aus Halle 1952 zur Verfü-

gung gestellt wurden, isolierte aus Herkünften Südost-Norwegens sechs Rassen. Sie sollen mit unseren zumeist übereinstimmen.

In Weihenstephan, Bayern, wurden aus einer dort gesammelten Mehltaupopulation auf dem Wege über Einsporkulturen drei Rassen isoliert. Aufhammer (1953) macht Angaben über ihren unterschiedlichen Befall auf einer Anzahl von Weizenarten und -sorten, von denen hier drei charakteristische genügen mögen:

Testsorte	Rasse A	Rasse B	Rasse C
T. monococcum var. *hornemanni*	1	3	0 (—1)
Estanzuela M 2 (*aestivum*)	4	0	0, 1—2
Reward (*aestivum*)	4	0	3—4

Die von ihm verwendeten Differentialwirte geben keine Möglichkeit, die Weihenstephan - Rassen mit anderen deutschen und ausländischen zu vergleichen.

c) Herkunftsanalysen

Die Analyse von Herkünften des Pilzes, die meist in Form von Konidienpopulationen verschiedener Rassen vorlagen, gelang nicht in jedem Falle. Ein Teil hatte durch den Transport so gelitten, daß die Abimpfungen nicht anwuchsen. Einige ergaben auf dem Testsortiment Befallsbilder, die keine eindeutige Bestimmung zuließen. Solche Herkünfte hätten in zahlreiche Einsporlinien zerlegt werden müssen, um ihre Zusammensetzung zu erkennen. Das mußte aus arbeitstechnischen Gründen unterbleiben. In den Jahren 1950 bis 1955 wurden 240 Herkünfte von *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* gesammelt. Von ihnen konnten 211 vermehrt und zur Infektion der Testsorten verwendet werden, wobei 16 ungeklärte Rassengemische ausschieden. Es blieben also 195 Mehltauproben, die auf Grund ihres Befalls auf fünf Differentialwirten (Testsorten 2 bis 6, Tab. 3) analysiert wurden. Die Häufigkeit des Vorkommens bestimmter Rassen in diesen Proben ist für die einzelnen Jahre in Tabelle 4 zusammengestellt. Aus Tabelle 5 ist außerdem die geographische Verbreitung der physiologischen Rassen zu ersehen, soweit sich darüber ein Eindruck aus unserem begrenzten Material gewinnen läßt.

In den sechs Beobachtungsjahren hat sich das allgemeine Rassenbild wenig verändert. Am häufigsten wurde Rasse 4 gefunden. Sie war nicht nur in Mitteldeutschland, sondern in ganz Deutschland verbreitet und lag auch in den wenigen erhalten gebliebenen ausländischen Herkünften vor, so in der Herkunft Admont (Österreich), Vollebekk (Norwegen) und Jokioinen (Finnland). Dagegen ist die sehr aggressive Rasse 10 offensichtlich selten. Sie wurde nur zweimal — 1953 in Kleinwanzleben Kreis Magdeburg, 1955 in Morl bei Halle — als Beimischung festgestellt und konnte durch Anreicherung auf den entsprechenden Testsorten gewonnen werden. Die Rassen 5, 6 und 8 besitzen ebenfalls eine geringere Häufigkeit und Verbreitung. Die wenig aggressiven Rassen 1 und 2 sind stets vorhanden, sie scheinen aber im Verlauf der Jahre verdrängt zu werden. In den Mehltauproben 1937 (Nover 1941/42, Tab. 6)

waren sie für das Befallsbild deutlich bestimmend bei 51 % der Herkünfte, 1950 und 1952 bei rund 30 %, 1953 bei 20 %, 1954 und 1955 bei nur 10 % der Herkünfte. Vermutlich sind sie öfter als Beimischung vorhanden gewesen. Ihr Befallsbild kann von dem einer aggressiveren Rasse so überdeckt worden sein, daß sie nicht mehr zu erkennen waren. Die übrigen Rassen, 3, 7 und 9,

Tabelle 4

Vorkommen der zehn physiologischen Rassen von *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* in den Jahren 1950 bis 1955

(Die Zahlen geben an, wie oft jede Rasse gefunden wurde)

	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1950—55
Rasse 1	4	—	5	5	3	2	19
Rasse 2	4	—	4	2	4	1	15
Rasse 3	4	1	3	1	11	5	25
Rasse 4	9	9	5	19	22	15	79
Rasse 5	1	—	2	1	3	3	10
Rasse 6	1	—	3	1	3	—	8
Rasse 7	3	1	—	3	4	3	14
Rasse 8	—	1	1	1	3	—	6
Rasse 9	—	2	4	1	9	1	17
Rasse 10	—	—	—	1	—	1	2
Summe der analysierten Herkünfte	26	14	27	35	62	31	195

Tabelle 5

Verbreitung der zehn physiologischen Rassen von *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* in den Jahren 1950 bis 1955

(Die Zahlen geben an, wie oft jede Rasse gefunden wurde)

Rasse	Norddeutschland						Mitteldeutschland						Süddeutschland						Westdeutschland			1951 Österreich	1953 Norwegen	1955 Finnland	1950/51
	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1950	1954	1955				
1	1				1		3		5	4	2	2				1									19
2	1		1				2		2	2	4				1				1		1				15
3					1		4		3	1	9	4		1				1		1					25
4	1			1		1	6	8	5	14	20	12	1			3	1		1	1	1	1	1	1	79
5						1	1		2	1	3	2													10
6							1		3	1	3														8
7							2	1		3	4	2	1								1				14
8					1			1	1	1	2														6
9					2			2	4	1	7	1													17
10										1		1													2

Summe der analysierten Herkünfte: 195

sind häufig vorhanden. Rasse 9 hat mit Sicherheit, Rasse 3 mit großer Wahrscheinlichkeit schon 1937 in mehreren Herkünften vorgelegen.

Ordnet man zusammenfassend die Rassen, wie wir sie in den vergangenen sechs Jahren gefunden haben, nach abnehmender Häufigkeit, so steht an erster Stelle Rasse 4 (79× aufgetreten), es folgen Rasse 3 (25×), dann Rasse 1, Rasse 9 und Rasse 2 in etwa gleicher Häufigkeit (rd. 15×), dann Rasse 5 (10×), schließlich die Rassen 6 (8×), 8 (6×) und 10 (2×) (Tab. 4 und 5 letzte Spalte).

3. Spezialisierung von *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *hordei* Marchal

Mains und Dietz berichteten 1930 über 5 Rassen des Erregers, die sich durch ihren Befall auf vier Gerstensorten leicht unterscheiden ließen. In den folgenden Jahren erhöhte sich die Zahl der Rassen in Nordamerika nach Untersuchungen von Tidd (1937), Cherewick (1944), Newton und Cherewick (1947), Jensen (1951) und Moseman (1956) durch Hinzunahme weiterer zwei

Tabelle 6

Befallstyp von 19 in Nordamerika vorkommenden physiologischen Rassen von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* auf Keimpflanzen von sechs Testsorten im Gewächshaus

Rasse	Testsorte						Autor
	Black Hull-less C. I. 666	Chevron C. I. 1111	Goldfoil C. I. 928	Heil's Hanna 3 C. I. 682	Nepal C. I. 595	Peruvian C. I 935	
I	0—2	0	0	1—2	1—2	0—1	Mains u. Dietz (1930)
II	1—2	0—1	0	4	4	1	
III	3—4	0—1	0	4	4	3—4	
IV	4	0	0	3—4	4	1	
V	3	—	4	4	4	4	
VI	0—2	0—1	0	3—4	0—1	0—1	Tidd (1937)
VII	0—1	0	3—4	3—4	0—1	0—1	
VIII	3	3—4	0	3—4	3—4	0—1	Newton u. Cherewick (1947)
IX	1—2	4	0	4	1—2	0—1	
X	1—2	0—1	0	4	1—2	3	
XI	4	4	0	4	4	4	
XII	1	3	4	4	1—2	1	
XIII	2	1	4	4	4	1—2	Jensen (1951)
XIV	1—2	4	0	4	3—4	1—2	Moseman (1956)
XV	1—2	1	0	4	3—4	4	
XVI	1	3—4	0	4	2	3—4	
XVII	1	4	0	4	4	4	
XVIII	1—2	0—1	4	4	0	3—4	
XIX	3—4	4	0	4	2	2	

Testsorten. Heute sind in den USA und Kanada 19 Gerstenmehltau-Rassen beschrieben, deren unterschiedlicher Befall auf den sechs Testsorten in Tabelle 6 angegeben ist. In Südamerika sind 2 Rassen bekannt, die alle diese Sorten stark befallen. Die Sorte Anoidium C. I. 7269 dient zur Unterscheidung dieser beiden argentinischen Rassen: Sie ist gegen Rasse Arg. 1 hochresistent, gegen Rasse Arg. 2 hochanfällig (FAVRET 1947).

Seit 1950 wird auch in Japan die Spezialisierung des Gerstenmehltau-Erregers bearbeitet. Zur Differenzierung der bisher dort festgestellten 11 Rassen sind die Sorten Goldfoil C. I. 928, Hanna C. I. 906 und Heil's Hanna 3 C. I. 682 geeignet. Außerdem werden die Sorte Nigrate C. I. 2444 (MAINS und MARTINI 1932) und zwei japanische Gersten verwendet (Tab. 7).

Tabelle 7

Befallstyp von elf in Japan vorkommenden physiologischen Rassen von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* auf Keimpflanzen von sechs Testsorten im Gewächshaus

(nach HIURA und HETA 1955)

Testsorte	Rasse										
	I	III	II	IV	VII	V	VI	VIII	IX	X	XI
Goldfoil C. I. 928	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	2
Hanna C. I. 906	4	3—4	4	4	4	3—4	4	4	0—1	4	4
Heil's Hanna 3 C. I. 682	0	0	4	4	3—4	0	0	3—4	4	0	0
Kairyo-bozu-mugi	1	1	3—4	1	1	1	4	1	1—2	1	1
Nakaizumi-zairai	1	1	1	1	1	3—4	1	3—4	1—3	1	1
Nigrate C. I. 2444	0	0	0	0	0	0	0	0	0—1	4	4

Bei einem Vergleich der japanischen Rassen mit den nordamerikanischen auf den in Tabelle 6 angeführten Testsorten zeigt sich, daß lediglich die Rasse IX Japan der Rasse III Amerika weitgehend ähnlich ist. Alle anderen sind von den amerikanischen Rassen deutlich verschieden, was sich in einigen Fällen nur unter Heranziehung zusätzlicher Testsorten (Hanna C. I. 906, Duplex C. I. 2433) nachweisen läßt (HIURA und HETA 1955).

In Deutschland gehen die grundlegenden Untersuchungen über die physiologische Spezialisierung von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* auf HONECKER, Bayerische Landessaatzuchtanstalt Weihenstephan, zurück (1934, 1935). Bei seinen Arbeiten hatte sich herausgestellt, daß die von MAINS und Mitarbeitern (1930, 1932) verwendeten Differentialwirte zur Bestimmung der deutschen Gerstenmehltau-Rassen nicht ausreichend waren. Die Charakterisierung von 9 Rassen auf sechs Gersten durch HONECKER ist in Tabelle 8 wiedergegeben.

Tabelle 8

Befallstyp der von HONECKER (1937) beschriebenen physiologischen Rassen von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* auf Keimpflanzen von sechs Testsorten im Gewächshaus

Testsorte	Rasse								
	A	H	I	D	B	G	E	C	F
Weihenstephan CP 127422	0	0—1	0	0	4	4	4	4	4
Ragusa b	0	2—3	3	4—3	0	0—1	1—2	4—3	0
H. spontaneum nigrum . . .	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Schweden 860	4	2	4	4	4	4	4	4	2—3
Samaria	1—2	3	1—2	2	2	3	1—2	3	2
Peruvian	1—2	4	4	4	4	2	4	1—2	1—2

Wie aus dieser Aufstellung ersichtlicht ist, sind die drei letztgenannten Sorten zu einer einwandfreien Rassendiagnose wenig geeignet. Die drei ersten haben dagegen für die Arbeiten in Deutschland, sowohl zur Differenzierung der Rassen von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* wie auch als Kreuzungseltern große Bedeutung. Mit ihnen wurden die Herkunftsanalysen in Weihenstephan und Halle fortgesetzt.

a) Testsortiment

Wir arbeiten heute mit einem Sortiment, das neben einer für alle Rassen hochanfälligen Sorte sieben Differentialwirte enthält. Unter diesen sind ausschließlich solche Sorten, die gegen gewisse Rassen hochresistent, gegen andere stark anfällig sind; d. h. daß nur zwischen der Bonitur 0 bis 0—1 bzw. 4 bis 3 zu entscheiden ist.

1.	Haisa oder Friedrichswerther Berg (Infektionskontrolle)	Sommer-G. *distichon* / Winter-G. *hexastichon*	
2.	Weihenstephaner CP 127 422 aus Criewener × Pflugs Intensiv	Sommer-G. *distichon*	(HONECKER 1937)
3.	Ragusa b aus einem dalmatinischen Landgerstengemisch	Wechsel-G. *hexastichon*	(HONECKER 1938)
4.	Weihenstephan Stamm 37/136 aus (Mahndorfer × Ragusa) × Peragis 12	Winter-G. *hexastichon*	(ULONSKA 1953)
5.	Weihenstephan Stamm 41/145 aus (Mahndorfer × Ragusa) × Friedrichswerther Berg	Winter-G. *hexastichon*	(ULONSKA 1953)
6.	Rinn 4	Sommer-G. *hexastichon*	(ULONSKA 1953)

	Hordeum spontaneum nigrum	Sommer-G. *spontaneum*	(HOFFMANN und KUCKUCK 1938)
	Voldagsen Stamm 8141/44 aus einer Kreuzung mit *Hordeum spontaneum nigrum*	Sommer-G. *distichon*	(RUDORF und WIENHUES 1951, ULONSKA 1953)
8.	Gatersleben Mutante 511 aus Friedrichswerther Berg	Winter-G. *hexastichon*	(BANDLOW 1951)

Die Mutanten 512, 513, 514, 515, 520 und 525 derselben Sorte zeigen die gleichen rassentypischen Befallsunterschiede wie Mutante 511. Die Mutante 501 dieser Sorte erwies sich als wertvoller Differentialwirt, mit dem das vorhandene Rassenspektrum eindeutig in weitere Rassen zerlegt werden kann. Sie war jedoch wiederholt mit abweichenden Typen vermischt, wahrscheinlich blüht sie zu offen ab. Wir sind bemüht, reine Linien davon zu vermehren. Sie sei hier vorläufig nur erwähnt, aber noch nicht weiter berücksichtigt.

b) Physiologische Rassen

Auf diesem achtgliedrigen Sortiment lassen sich 16 Rassen deutlich differenzieren (Tab. 9). Die Nomenklatur der in Deutschland vorkommenden Gerstenmehltau-Rassen mit Buchstaben ist der Praxis seit den Arbeiten HONECKERS geläufig. Solange eine Abstimmung auf einem international anerkannten Testsortiment nicht erreicht werden kann, mag sie auch zur Kennzeichnung dieser Rassen gegenüber den in anderen Ländern nachgewiesenen einen gewissen Sinn haben. Anzustreben ist aber das zweckmäßige Durchnumerieren, wie es z. B. bei den Rassen der Getreide-Rostpilze üblich ist.

Mit Hilfe der Sorten Weihenstephan CP und Ragusa b ergibt sich ein einfacher Bestimmungsschlüssel für die 4 Rassengruppen:

Weihenstephan CP resistent

Ragusa b resistent	Rassengruppe A
Ragusa b anfällig	Rassengruppe D

Weihenstephan CP anfällig

Ragusa b resistent	Rassengruppe B
Ragusa b anfällig	Rassengruppe C

HONECKER (1949) erkannte, wie aus seinem züchterischen Testament hervorgeht, daß sich auf einigen seiner Zuchtstämme eine weitergehende Spezialisierung erfassen ließ. Diese Beobachtung bestätigte sich in den folgenden Jahren in Weihenstephan (ULONSKA 1953).

Unabhängig davon ließen sich Unstimmigkeiten in eigenen Arbeiten als ähnliche Erscheinung aufklären. Im Institut für Kulturpflanzenforschung Gatersleben erzeugte Röntgenmutanten der Wintergerste Friedrichswerther Berg waren im Frühjahr 1951 mit den „Rassen“ A, B und D getrennt im Gewächshaus künstlich infiziert worden. In zwei Prüfungen hatten sich von

Tabelle 9

Befallstyp der 16 physiologischen Rassen von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* auf Keimpflanzen von acht Testsorten im Gewächshaus

Testsorte	Rassengruppe A					D		B						C		
	Rasse					Rasse		Rasse						Rasse		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	A_1	A_2	A_3	A_4*	A_5*	D_1	D_3*	B_2	B_3	B_4**	B_5*	B_6 (=F)	B_7 (C_1)	C_2	C_3*	C_4*
1 Haisa (hochanfällige Kontrolle)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
2 Weihenstephan CP 127422	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3 Ragusa b	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	4	4	4
4 Weihenstephan Stamm 37/136	0	4	0	4	0	4	4	4	0	0	4	4	4	4	4	4
5 Weihenstephan Stamm 41/145	0	0	4	0	0	4	4	4	4	0	0	0	0	4	4	4
6 Rinn 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4
7 *Hordeum spontaneum nigrum* Voldagsen St. 8141/44	0	0	0	0	3—4	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	3
8 Gatersleben Mutante 511	4	0—1n	4	4	0—1n	0—1n	4	0—1n	0—1n	—	4	4	0—1n	0—1n	4	0—1n

* Bisher nur in Halle nachgewiesen.

** Bisher nur in Weihenstephan nachgewiesen (ULONSKA 1953).

64 Mutanten acht — bei den Testsorten sind sie bereits genannt — als resistent gegen die 1950 isolierten Rassen A und D erwiesen. Während BANDLOW 1951 im Rahmen eines Referats über züchterisch wertvolle Mutanten auch von deren Mehltauresistenz berichtete, zeigten dieselben Mutanten im Herbst des gleichen Jahres plötzlich starken Befall. Wir hatten dazu die Rassen A und D aus Mehltauherkünften des Jahres 1951 frisch isoliert und nach dem angeführten Bestimmungsschlüssel auf den Sorten Weihenstephan CP und Ragusa b identifiziert. Eine sorgfältige Überprüfung durch gleichzeitige Infektion des Saatgutes verschiedener Ernten mit Infektionsmaterial aus den Herkünften 1950 und aus denen des Jahres 1951 gab die Erklärung für die zunächst widerspruchsvollen Ergebnisse: Auf den resistenten Mutanten trat eine physiologische Spezialisierung in Erscheinung, die auf den Testsorten Weihenstephan CP und Ragusa b bis dahin nicht erkannt werden konnte. Diese Mutanten wurden deshalb eine wertvolle Ergänzung unseres Testsortiments, daß durch die dankenswerte Unterstützung ULONSKAS mit den Sorten 4—6 aus Weihenstephan weiter vervollständigt wurde.

Auf den Sorten Weihenstephan CP und Ragusa b bestimmen wir die vier Rassengruppen und bezeichnen sie nach HONECKER A, B, C und D. Die in Tabelle 9 anschließend aufgeführten Differentialwirte (4—8) ermöglichen ihre Aufgliederung in zahlreiche, deutlich voneinander unterscheidbare Rassen. So sind heute in der Rassengruppe A fünf Rassen bekannt, von denen A_1, A_2 und A_3 auch in Weihenstephan nachgewiesen wurden (ULONSKA 1953). In der Rassengruppe D unterscheiden wir Rasse D_1, welche die Mutante 511 nicht befällt, von der Rasse D_3, die diese Testsorte stark befällt. ULONSKA (l. c.) gibt noch eine Rasse D_2 an, die er für identisch mit der Rasse H von HONECKER (vgl. Tab. 8) hält. Sie verursacht auf der Sorte Weihenstephan CP schwachen Befall (Typ 1), auf Ragusa b mäßigen Befall (Typ 2), im übrigen gleicht sie der Rasse D_1. Die Rasse D_2 ist in Tabelle 9 nicht mit angeführt, ebenso auch nicht die von ULONSKA beschriebene Rasse B_1, die der Rasse B_3 sehr ähnlich ist.

Alle Rassen, welche die Testsorte Weihenstephan CP, aber nicht die Testsorte Ragusa b zu befallen vermögen, sind in der Rassengruppe B zusammengestellt. Genannt sind hier die Rassen B_2 und B_3, beide in Weihenstephan und Halle übereinstimmend nachgewiesen, ferner B_4, die bei uns noch nicht vorgelegen hat; daher ist ihr Verhalten auf der Mutante 511 unbekannt. B_5 dagegen wurde nur in Halle identifiziert. B_6 ist bisher als Rasse F bekannt. HONECKER beschrieb sie 1937 (vgl. Tabelle 8). Sie war in Weihenstephan im Gewächshaus spontan aufgetreten und vermutlich mutativ entstanden. Als einzige Rasse befiel sie damals *Hordeum spontaneum nigrum*. Inzwischen wurden auch in den Gruppen A und C Rassen gefunden, die diese Testsorte in ihren Wirtspflanzenkreis einbeziehen. In Halle entstand die Rasse B_6 (F) im Jahre 1953 und 1955 spontan im Gewächshaus, beide Male aus der Rassengruppe B (NOVER und MANSFELD 1956).

Rasse B_7 (Halle) stimmt in ihrem Befall auf den Testsorten in Tabelle 9 mit der in Weihenstephan C_1 genannten Rasse völlig überein. Sie unterscheiden sich jedoch auf der Sorte Dalmatinische Ragusa a. Diese ist gegen

B_7 resistent, für C_1 soll sie, wie ULONSKA (1953) beschreibt, stark anfällig sein. Daß er seine Rasse der Gruppe C zuordnet, wird mit ihrem starken Befall der Sorte Rinn 4 begründet, der für die Rassengruppe C charakteristisch sei. Dagegen wird in Halle der starke Befall auf Weihenstephan CP und Ragusa b als entscheidend für Rassengruppe C angesehen. Es sind in der Gruppe C die an beiden Orten nachgewiesene Rasse C_2, ferner die Rassen C_3 und C_4 erwähnt, welche nur in Halle beschrieben wurden.

c) Herkunftsanalysen

In den sechs Jahren 1950—1955 wurden 198 Proben von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* gesammelt, von denen 172 vermehrt werden konnten. Eine Herkunftsanalyse gelang in 165 Fällen, sieben blieben als Rassengemische ungeklärt. Das Testsortiment enthielt zunächst lediglich die Differentialwirte Weihenstephan CP und Ragusa b und wurde erst im Verlauf der Jahre vervollständigt. Daher müssen sich die Angaben über Häufigkeit (Tab. 10) und Verbreitung (Tab. 11) in der sechsjährigen Beobachtungsperiode auf Rassengruppen beschränken, über einzelne Rassen liegen nur Aufzeichnungen aus den Jahren 1953—1955 vor (Tab. 12).

In Herkunftsanalysen aus den Jahren 1933—1936 hatte HONECKER (1937) gefunden, daß die Rasse A weitaus vorherrschte, B und D zwar weit verbreitet waren, aber immer nur in Spuren als Beimischung zu A vorkamen. Die übrigen Rassen traten nur in Zuchtgärten vereinzelt auf; er bezeichnete sie als Zufallsrassen. Die Rasse F entstand nur einmal im Gewächshaus. Seinen Befund bestätigte er in einem Erfahrungsbericht 1943 und noch 1949 in seinem züchterischen Testament. Selbst der seit 1936 ständig zunehmende Anbau Weihenstephaner Züchtungen, welche vorwiegend gegen die Rassen A und D resistent waren, hatte demnach das Rassenspektrum nicht grundsätzlich verschoben. RUDORF und WIENHUES (1951) wiesen darauf hin, daß sich seit 1949 die Zusammensetzung der Mehltaupopulationen in Norddeutschland anscheinend verändert habe zugunsten der Rassen B und D.

Die Untersuchungen in Halle zu dieser Frage setzten 1950 ein. Aus verkehrstechnischen Gründen erstreckten sie sich in der Hauptsache auf Mitteldeutschland. Da sich aber in diesem Raum zahlreiche Sortimentsgärten befinden, so z. B. in Gatersleben, Kleinwanzleben, Hadmersleben, Stichelsdorf, Hohenthurm, ist vom Wirtspflanzenkreis aus die Möglichkeit zur Anreicherung aller Rassen gegeben. Nach eigenen Erfahrungen wirkt sich die Selektion durch bestimmte Wirtssorten auf die Veränderung von Mehltaupopulationen stärker aus als klimatische Faktoren.

Das Bild der Herkunftsanalyse 1950 entspricht dem von HONECKER in den vorhergehenden Jahren beobachteten. Rassengruppe A überwiegt in mehr als 50 % der Fälle, die Rassengruppen B und D sind in mittlerer Häufigkeit (20 % bzw. 15 %) vorhanden, die Rassengruppe C ist selten. 1951 sind vor allem in Mitteldeutschland die A-Rassen um 30 % zurückgegangen zugunsten der anderen Rassengruppen; C hat um rund 10 % zugenommen. ULONSKA (1953) findet im gleichen Jahre in 12 Herkünften, vorwiegend aus Süd- und Westdeutschland, die Rassengruppe A noch stark ver-

breitet, die Gruppen B, D und C in mittlerer Häufigkeit. Doch stellt auch er eine deutliche Zunahme dieser Rassengruppen im folgenden Jahre fest. 1952 haben in Mitteldeutschland die A-Rassen weiter abgenommen, die Rassengruppe C ist wieder um rund 10 % angestiegen. Ebenso ist in den folgenden Jahren ein ständiges Absinken der relativen Häufigkeit von Rassengruppe A zu beobachten. Sie wird 1953 in 15 % der Herkünfte gefunden, davon entfallen 9 % auf deutsche Herkünfte. 1954 ist sie überhaupt nicht nachzuweisen, 1955 beträgt ihr Anteil nur 4 %. Entsprechend vermehrt sich die Rassengruppe C in den Populationen von etwa 50 % in den Jahren 1953/54 auf über 75 % 1955.

Tabelle 10

Vorkommen der Rassengruppen A, D, B und C von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in den Jahren 1950 bis 1955

(Die Zahlen geben an, wie oft jede Rassengruppe gefunden wurde)

Rassen-gruppe	1950		1951		1952		1953		1954		1955		1950/1955
	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	
A	12	60%	9	29%	5	23%	5	15%	0	0%	2	4%	33
D	3	15%	6	19%	7	32%	4	11%	4	29%	0	0%	24
B	4	20%	11	36%	4	18%	6	18%	4	29%	8	18%	37
C	1	5%	5	16%	6	27%	19	56%	6	42%	34	77%	71
Summe der analysierten Herkünfte	20		31		22		34		14		44		165

Tabelle 11

Verbreitung der Rassengruppen A, D, B und C von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in den Jahren 1950 bis 1955

(Die Zahlen geben an, wie oft jede Rassengruppe gefunden wurde)

Rassengruppe	Nord-deutschland						Mittel-deutschland						Süd-deutschland						West-deutschland						1951 Österreich	1953 Norwegen	1950/1955
	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1950	1951	1952	1953	1954	1955			
A		1					11	7	5	2		1		1		1		1	1							2	33
D		1			1		3	4	7	4	3														1		24
B						1	4	8	4	6	4	7								3							37
C						2	1	3	6	18	6	32								2		1					71

Summe der analysierten Herkünfte: 165

Durch den Großanbau von Sorten mit Resistenz gegen die Rassen A und D werden diese offensichtlich benachteiligt. Auf solchen Sorten wäre eine Zunahme der Rassengruppe B zu erwarten gewesen. Daß sie nicht erfolgte, ist wahrscheinlich auf die starke Ausbreitung der aggressiveren C-Rassen zurückzuführen. Die Rassen A_5, B_6 und C_4, welche die Resistenz von *Hordeum*

Tabelle 12

Vorkommen einzelner Rassen
von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in den Jahren 1953 bis 1955
(Die Zahlen geben an, wie oft jede Rasse gefunden wurde)

	1953	1954	1955
Rassengruppe A			
Rasse A_2	3	—	—
Rasse A_4	2	—	1
Rasse A_5	—	—	1
Rassengruppe D		1*	
Rasse D_1	1	3	—
Rasse D_3	3	—	—
Rassengruppe B	1*		
Rasse B_2	4	1	4
Rasse B_3	1	—	1
Rasse B_5	—	1	—
Rasse B_7	—	2	3
Rassengruppe C			
Rasse C_2	2	5	14
Rasse C_3	17	1	18
Rasse C_4	—	—	2
Summe der analysierten Herkünfte ...	34	14	44

* Nicht genauer identifiziert.

spontaneum nigrum zu durchbrechen vermögen, sind noch selten, wie Tab. 12 besagt. Die Rasse A_5 wurde aus der Herkunft Gießen 1955 isoliert. C_4, mit mit Rasse C_3 vermischt, lag in Herkünften aus den Sortimentsgärten Hadmersleben und Gatersleben vor. Die Rasse B_6 (= F) wurde bei uns bisher in keiner Herkunft festgestellt, doch fand ULONSKA (1953) sie einmal in einem Zuchtbetrieb Mittelfrankens. Das Zahlenmaterial der Tabelle 12 ist zu gering, um im Einzelnen weitergehende Schlüsse zu ziehen. Sie ist mehr als Ergänzung der Übersicht (Tab. 10) über das Vorkommen der Rassengruppen gedacht.

Es sei noch hingewiesen auf je eine „nicht genauer identifizierte" Rasse in den Gruppen D und B (Tab. 7). Sie zeigten deutlich abweichendes Verhalten von allen Rassen, die in Tabelle 4 beschrieben sind. Bei der Besprechung der Testsorten wurde schon erwähnt, daß sich durch Hinzunahme der Gaterslebener Mutante 501 weitere Rassen unterscheiden lassen. Die Zahl der Mehltaurassen ist demnach größer, als bisher exakt erfaßt und nachgewiesen werden konnte.

Den Rassenanalysen schlossen sich Resistenzprüfungen an, die an dem Gersten- und Weizensortiment des Instituts für Kulturpflanzenforschung Gatersleben durchgeführt wurden. Die Infektion der Gersten mit 4 Rassen

aus den Gruppen A, B, C und D sind abgeschlossen. Die Ergebnisse wurden bereits an anderer Stelle (NOVER und MANSFELD 1955, 1956) mitgeteilt. Die Untersuchungen an dem etwa 5500 Proben umfassenden Weizensortiment beschränkten sich bisher auf etwa die Hälfte davon. Sie werden fortgesetzt; über ihr Ergebnis wird nach Abschluß der Arbeiten zu berichten sein.

Zusammenfassung

Zur Bestimmung physiologischer Rassen von *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* wurde ein Testsortiment aufgestellt. Es setzt sich aus sieben Sorten zusammen, bzw. aus sieben Gruppen von Sorten, die nach unseren Beobachtungen ein übereinstimmendes Resistenzverhalten zeigen.

Auf diesem Sortiment wurden 10 Weizenmehltau-Rassen nach ihrem Befall unterschieden.

Aus dem Vorkommen der einzelnen Rassen in 195 Herkünften wurde auf ihre Häufigkeit und Verbreitung in den Jahren 1950—1955 geschlossen. Am häufigsten verbreitet war Rasse 4, sie lag in 79 Herkünften vor. Nach abnehmender Häufigkeit geordnet, folgten die ihr sehr ähnliche Rasse 3, die wenig aggressiven Rassen 1 und 2, die aggressiven Rassen 7 und 9 sowie schließlich Rasse 5 und Rasse 6. Die Rassen aus der virulenten Gruppe 8 und 10 sind bisher selten festgestellt worden.

Zu entsprechenden Untersuchungen an *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* wurden sechs in Weihenstephan erarbeitete Differentialwerte verwendet. Eine wertvolle Ergänzung erfuhr das Testsortiment durch eine Reihe mehltauresistenter Mutanten der Wintergerste Friedrichswerther Berg (Gatersleben Mutante 511 u. a.).

Auf acht Testsorten wurde das Befallsbild von 16 Rassen des Gerstenmehltau-Erregers beschrieben. Nach der Nomenklatur von HONECKER gehören fünf von ihnen in die Rassengruppe A, sechs in die Gruppe B, drei in die Gruppe C und zwei in die Gruppe D. Aus den Analysen von 165 Pilzherkünften der Jahre 1950—1955 wurde deutlich, daß die wenig aggressive Rassengruppe A, zumindest in Mitteldeutschland, stark zurückgegangen ist, während sich die aggressive Rassengruppe C in gleichem Maße verbreitete. Die Rassen der Gruppen B und D waren ständig in mäßiger Häufigkeit vorhanden.

Summary

Six years of studies on physiologic specialisation of powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC.) of wheat and barley in Germany.

The adequacy of different wheat varieties for determining pathogenic races of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* is described.

Ten races were distinguished by the disease reactions of the differential varieties Salzmünde Stamm 14/44, Red Fern, Axminster, Normandie, Halle Stamm 13 471 and Schwarzer Persischer (Tab. 3).

In 195 samples, most of which collected in Middle-Germany, the races were identified (Tab. 4) and their geographical distribution in the years 1950—1955 was determined (Tab. 5). Race 4 was the most common one, it was found in 79 collections. Ranged according to their prevalence it was followed by the rather similar race 3, then by the little aggressive races 1 and 2, the aggressive races 7 and 9, at last by race 5, and race 6. The physiological forms of the virulent group 8 and 10 have been isolated only occasionally.

For corresponding studies on *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* six differential varieties of the Bayerische Landessaatzuchtanstalt Weihenstephan have been employed: Weihenstephan CP 127 422, Ragusa b, Weihenstephan 37/136, Weihenstephan 41/145, Rinn 4 and *Hordeum spontaneum nigrum* (or Voldagsen Stamm 8141/44). Several mildew resistant mutants of the winterbarley Friedrichswerther Berg, Gatersleben Mutante 511 for instance, have proved as useful additions.

Sixteen races of barley mildew are distinguished by the reactions of 8 differential varieties (Tab. 9).

By analysing 165 fungus collections in the years 1950—1955 it was demonstrated that the group of the little aggressive races A evidently have lost their prevalence, at least in Middle-Germany, while the aggressive races of group C have been spreading in the same measure. The forms of group B and D were found in moderate frequency (Tab. 10, 11, 12).

Vielen deutschen und ausländischen Stationen möchte ich für die Einsendung von Mehltauproben danken. Die Bayerische Landessaatzuchtanstalt Weihenstephan (Freising) und Norges Landbrukshøgskole Vollebekk (Norwegen) stellten darüber hinaus Saatgut von Testsorten zur Verfügung. Fräulein A. Seidenfaden und Fräulein I. Simon danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen.

Literaturverzeichnis

Allen, J. P., 1955: The role of a self-inhibitor in the germination of rust uredopores. Phytopathology **45**, 259—266.

Aufhammer, G., 1953: Die Züchtung mehltauresistenter Weizensorten. Landw. Jb. Bayern **30** (Sonderheft Juni), 14—27.

Bandlow, G., 1951: Mutationsversuche an Kulturpflanzen II. Züchterisch wertvolle Mutanten bei Sommer- und Wintergersten. Züchter **21**, 357—363.

Cherewick, W. J., 1944: Studies of the biology of *Erysiphe graminis* DC. Canad. J. Res. (C) **22**, 52—86.

Domsch, K. H., 1954: Keimungsphysiologische Untersuchungen mit Sporen von *Erysiphe graminis.* rch. Mikrobiol. **20**, 163—175.

Favret, E. A., 1947: Hallazgo de una nueva raza de „*Erysiphe graminis hordei*". Rev. Inst. Agric. Buenos Aires **1**, 237—240.

Gorter, G. J. M. A., 1955: Powdery mildew of wheat. Farming South Africa **30**, 281—282.

Graf-Marin, A., 1934: Studies on powdery mildew of cereals. Cornell Univ., Agric. Exp. Sta. Memoir **157**, 3—48.

Hiura, U., und H. Heta, 1955: Studies on the disease-resistance in barley III. Further studies on the physiologic races of *Erysiphe graminis hordei* in Japan. Ber. Ohara Inst. Landw. Biol., Okayama Univ. **10**, 135—156.

Hoffmann, W., und H. Kuckuck, 1938: Versuche zur Züchtung spelzenfreier, eiweißreicher und mehltauwiderstandsfähiger Gersten. Z. Pflanzenzüchtung **22**, 271—302.

Honecker, L., 1934: Über die Modifizierbarkeit des Befalles und das Auftreten verschiedener physiologischer Formen beim Mehltau der Gerste *Erysiphe graminis hordei* Marchal. Z. Pflanzenzüchtung **19**, 577—602.

— —, 1935: Weitere Mitteilungen über das Vorkommen biologischer Rassen des Gersten-Mehltaues (*Erysiphe graminis hordei* Marchal), ihre Verbreitung in Deutschland und die sich daraus ergebenden Richtlinien für die Immunitätszüchtung. Züchter **7**, 113—119.

— —, 1937: Die Bestimmung der physiologischen Rassen des Gerstenmehltaues (*Erysiphe graminis hordei* Marchal). Phytopath. Z. **10**, 197—222.

— —, 1938: Über die physiologische Spezialisierung des Gerstenmehltaues als Grundlage für die Immunitätszüchtung. Züchter **10**, 169—181.

— —, 1943: Resistenzzüchtung gegen Mehltau und Rost bei Gerste. Erfahrungen und Ergebnisse vierzigjähriger Züchtungsarbeit. Z. Pflanzenzüchtung **25**, 209—234.

— —, 1949: Resistenzzüchtung an Gerste. Züchterisches Testament. Z. Pflanzenzüchtung **28**, 85—89.

Jensen, N. F., 1951: Powdery mildew of barley. Studies of yield losses and the inheritance of disease resistance. Cornell Univ., Agric. Exp. Sta. Memoir **305**.

Lowther, C. V., 1950: Pathogenicity of physiologic races of *Erysiphe graminis tritici* in the southeastern United States. Phytopathology **40**, 872 (Abstr.).

Mains, E. B., 1933: Host specialisation of *Erysiphe graminis tritici*. Proc. Nat. Acad. Sci. **19**, 49—53.

— —, and S. M. Dietz, 1930: Physiologic forms of barley mildew, *Erysiphe graminis hordei* Marchal. Phytopathology **20**, 229—239.

— —, and M. L. Martini, 1932: Susceptibilitiy of barley to leaf rust (*Puccinia anomala*) and to powdery mildew (*Erysiphe graminis hordei*). U. S. Dep. Agric., Techn. Bull. 295.

Moseman, J. G., 1956: Physiologic races of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in North America. Phytopathology **46**, 318—322.

Newton, M., and W. Cherewick, 1947: *Erysiphe graminis* in Canada. Canad. J. Res. **25**, 73—93.

Nover, I., 1941/42: Untersuchungen über den Weizenmehltau, *Erysiphe graminis tritici*, im Rahmen der Resistenzzüchtung. Z. Pflanzenzüchtung **24**, 71—103.

— —, und R. Mansfeld, 1955: Resistenzeigenschaften im Gersten- und Weizensortiment Gatersleben I. Prüfung von Sommergersten auf ihr Verhalten gegen *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *hordei* Marchal. Kulturpflanze **3**, 105—113.

— —, und — —, 1956: Resistenzeigenschaften im Gersten- und Weizensortiment Gatersleben II. Prüfung von Wintergersten auf ihr Verhalten gegen *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *hordei* Marchal. Kulturpflanze **4**, 341—349.

Pugsley, A. T., and M. C. Carter, 1953: The resistance of twelve varieties of *Triticum vulgare* to *Erysiphe graminis tritici*. Austral. J. Biol. Sci. **6**, 335—346.

Roemer, Th., 1941/42: Ausgangsmaterial für die Resistenzzüchtung bei Getreide. Ergebnisse 20jähriger Arbeit der Pflanzenzuchtstation Halle a. S. Z. Pflanzenzüchtung **24**, 304—332.

Rosenstiel, K. von, 1938: Untersuchungen über den Weizenmehltau *Erysiphe graminis tritici* (D.C.), seine physiologische Spezialisierung sowie die züchterischen Möglichkeiten seiner Bekämpfung. Züchter **10**, 247—255.

Rudorf, W., und F. Wienhues, 1951: Die Züchtung mehltauresistenter Gersten mit Hilfe einer resistenten Wildform (*Hordeum spontaneum nigrum* H 204). Z. Pflanzenzüchtung **30**, 445—463.

Schlichting, I., 1938: Untersuchungen über die physiologische Spezialisierung des Weizenmehltaus *Erysiphe graminis tritici* (D.C.) in Deutschland. Vorl. Mitt. Kühn-Archiv **48**, 52—55.

Strand, E., 1954: Resistensforedling av korn. Norsk. Landbr. **20**, 118—121.

Taylor, J. W., H. A. Rodenhiser und B. B. Bayles, 1949: Physiologic races of *Erysiphe graminis tritici* in the southeastern United States. Agron. J. **41**, 134—135.

Tidd, S. J., 1937: Studies concerning the reaction of barley to two undescribed physiologic races of barley mildew *Erysiphe graminis hordei.* Phytopathology **27**, 51—68.

Ulonska, E., 1953: Die Bedeutung der Mehltauresistenz in der Gerstenzüchtung und Stand der Rassenverbreitung im Bundesgebiet. Landw. Jb. Bayern **30** (Sonderheft Juni), 209—228.

Vallega, J., y H. Cenoz, 1941: Reaccion de algunos trigos a las razas fisiologicas de *Erysiphe graminis tritici* communes en Argentina. An. Inst. Fitotéc. Santa Catalina **3**, 45—58.

Weller, K., und L. Lechner, 1953: 50 Jahre Bayerische Pflanzenzüchtung. Landw. Jb. Bayern **30** (Sonderheft Januar).

Yarwood, C. E., 1950: Water content of fungus spores. Amer. J. Bot. **37**, 636—639.

Aus der Eidgenössischen Landwirtschaftlichen Versuchsanstalt Zürich-Oerlikon
Vorstand: Dr. R. Salzmann

Über die Beeinflussung von Pathogenität und Wachstum pflanzlicher Parasiten

III. Vitamine B_1 und Biotin; *Calonectria graminicola;* Beeinflussung durch die Temperatur

Von

Hans Zogg

In einer früheren Arbeit (Zogg 1957) wurde gezeigt, daß die Vitamine B_1 und Biotin die Pathogenität des Parasiten *Calonectria graminicola* (Berk. et Br.) Wr. auf jungen Weizenpflanzen präinfektionell zu beeinflussen vermögen. Wie bereits mitgeteilt, scheinen die Umweltbedingungen einen Einfluß auf die Reaktionslage auszuüben. Bei den unter nicht konstanten Temperaturen im Laboratorium durchgeführten Versuchen konnte in gewissen Fällen eine Depression, in anderen Fällen keine Beeinflussung, wieder in anderen Fällen eine Verstärkung des Befallsgrades festgestellt werden. Die beiden hier publizierten Versuche lassen erkennen, daß mit der Variierung der Temperatur eine Inversion herbeigeführt werden kann, nämlich in dem Sinne, daß mit steigenden Biotingaben die Pathogenität bei tieferen Temperaturen eine Verstärkung, bei höheren Temperaturen dagegen eine Depression erfährt. Worauf diese Einflüsse zurückzuführen sind, ist nach wie vor unbekannt. Die Versuchsmethodik ist dieselbe wie bereits beschrieben (Zogg l. c.). Die Nährlösung enthielt überall 5 γ/l B_1, nur der Biotinzusatz wurde geändert. Die Kulturen wurden jedoch in temperaturkonstanten Räumen[1]) gehalten

[1]) Für die Erlaubnis zur Benützung der Thermostaten möchte ich Herrn Professor Dr. E. Gäumann, Institut für spezielle Botanik, E.T.H. Zürich, meinen besten Dank aussprechen.

und die Infektion im Laboratorium bei Zimmertemperatur in Tontöpfen durchgeführt. Die Resultate sind folgende:

Tabelle 1

Einfluß von Biotin auf die Pathogenität (K %) und des Wachstums (mg) von *Calonectria graminicola* bei drei verschiedenen Temperaturen

5 γ/l B_1 +	Myzelwachstum (mg)			Krankheitsindizes (K %)		
	10 °C	17 °C	28 °C	10 °C	17 °C	28 °C
0 γ/l Biotin	1,9	1,8	0,8	32,3	45,9	52,7
0,5 γ/l Biotin	123,3	366,1	1,8	49,3	52,6	55,9
5 γ/l Biotin	95,1	220,9	2,3	50,5	50,7	51,6
50 γ/l Biotin	130,1	236,7	6,3	58,8	43,6	34,6
500 γ/l Biotin	140,9	202,8	2,3	61,2	48,0	35,4

Die Streuungszerlegung der Krankheitsindizes wies für den t-Test folgende Werte auf: Grenzdifferenz 5 % : 7,4; 1 % : 9,8; 0,1 % : 12,8; für die nicht infizierten Pflanzen wurde ein „Krankheitsindex" von 6,3 % festgestellt.

Tabelle 2a

Wiederholung des ersten Versuches (Tabelle 1) bei sieben verschiedenen Temperaturen; Myzelwachstum (mg)

5 γ/l B_1 +	Myzelwachstum (mg)						
	9 °C	12 °C	14 °C	17 °C	20 °C	24 °C	26 °C
0 γ/l Biotin	11,2	12,0	8,7	9,0	10,3	14,5	4,7
0,5 γ/l Biotin	111,1	159,8	217,6	296,4	552,2	574,5	431,0
5 γ/l Biotin	102,3	171,3	151,0	234,2	329,5	542,0	336,1
50 γ/l Biotin	94,1	166,7	137,0	251,1	415,6	506,2	383,2
500 γ/l Biotin	108,3	183,7	172,3	260,1	340,8	505,0	346,4

Tabelle 2b

(siehe Tabelle 2a); Krankheitsindizes K %

5 γ/l B_1 +	Krankheitsindizes (K %)						
	9 °C	12 °C	14 °C	17 °C	20 °C	24 °C	26 °C
0 γ/l Biotin	47,1	39,7	41,3	60,0	58,1	58,2	52,7
0,5 γ/l Biotin	44,1	49,3	54,9	58,1	60,4	57,2	56,8
5 γ/l Biotin	45,0	48,0	56,9	63,1	61,0	57,3	62,8
50 γ/l Biotin	52,1	54,9	57,7	60,7	62,0	46,7	39,0
500 γ/l Biotin	60,9	55,5	63,9	66,1	58,9	44,8	32,0

Grenzdifferenzen: 5 % : 6,0; 1 % : 7,9; 0,1 % : 10,1. Nicht infiziert: 6,3 %.

Diskussion der Resultate

Auch aus diesen Versuchen ist sofort zu ersehen, daß das Wachstum und die Pathogenität auf keinen Fall parallel gehen (Zogg l. c.); das vegetative Wachstum des Parasiten spielt demnach keine Rolle. Die Pathogenität des Parasiten wird durch Zugabe von Biotin präinfektionell beeinflußt. Dabei spielt die Temperatur eine entscheidende Rolle.

1. Das Verhalten der Pathogenität innerhalb derselben Temperatur bei steigenden Biotingaben.

Bei den Temperaturen zwischen 9 und 14 °C ist eine merkliche Steigerung der Pathogenität festzustellen. Zwischen 17 und 20 °C ist keine Beeinflussung vorhanden. Zwischen 24 und 28 °C tritt dagegen ein merklicher Abfall der Pathogenität mit steigenden Biotingaben ein (Inversion des Verhaltens hinsichtlich der Pathogenität).

2. Das Verhalten der Pathogenität innerhalb derselben Biotingaben bei steigender Temperatur.

Bei den Biotingaben von 0—5 γ/l ist ein leichter, bei 5 γ/l ein deutlicher Anstieg der Pathogenität zu bemerken. Zwischen 5 und 50 γ/l Biotin tritt die Inversion auf, und die Pathogenität zeigt ein deutliches Abfallen mit steigender Temperatur bei 50 und 500 γ/l Biotin.

Diese Resultate bestätigen, daß unter den gegebenen Versuchsverhältnissen das Verhalten der *Calonectria graminicola* auf jungen Weizenpflanzen auf den ersten Blick als labil zu bezeichnen ist, jedoch durch die Temperatur gesteuert werden kann.

Summary

Upon influencing pathogenicity and growth of plant parasites

III. Vitamins B_1 and Biotin; *Calonectria graminicola*; influence of temperature

In a previous publication (Zogg, 1957) it was shown that the pathogenicity is influenced by B_1 and Biotin. This publication deals with the preinfectional influence of the temperature on the pathogenicity of *Calonectria graminicola* grown on nutrient solutions with different contents of Biotin. The results:

1. As published previously growth and pathogenicity are completely independent of each other.
2. Changement of the pathogenicity within the same temperature and increased Biotin-content:

Between 9 und 14 °C a real increase of the pathogenicity with increased Biotin-contend happens. Between 17 and 20 χ there is

neither an increase nor a decrease, but between 24 and 28 °C a real decrease of the pathogenicity takes place (inversion).

3. Changement of the pathogenicity within the same Biotin-content and increased temperature: 0—5 γ/l Biotin contents induce a slight increase of the pathogenicity at increasing temperatures (5 γ/l real increase) between 5 and 50 γ/l the inversion takes place and between 50 and 500 γ/l a real decrease of the pathogenicity can be shown.

The phatogenicity is conducted not only by B_1 and Biotin, but also by the temperature.

Literaturverzeichnis

Zogg, H., 1957: Über die Beeinflussung von Pathogenität und Wachstum pflanzlicher Parasiten. II. Vitamine B_1 und Biotin; *Calonectria graminicola.* Phytopath. Z. 29 (1), 65—71.

IX. Internationaler Botaniker-Kongreß

Der IX. Internationale Botaniker-Kongreß findet statt vom 19. bis 29. August 1959 an der Universität Montreal und an der McGill-Universität in Montreal (Canada). Das Programm wird Vorträge und Symposien über alle Zweige der reinen und angewandten Botanik enthalten. Ein erstes Rundschreiben mit Informationen über Programm, Unterbringung, Exkursionen und andere Einzelheiten wird Anfang 1958 erscheinen. Dieses und alle weiteren Rundschreiben einschl. Anmeldeformulare erhalten nur diejenigen, die dem Generalsekretär wegen Aufnahme in die Kongreß-Postliste schreiben. (Anschrift s. unten.)

The Ninth International Congress

will be held in Montreal, Canada, from August 19 to 29, 1959, at McGill University and the University of Montreal. The program will include papers and symposia related to all branches of pure and applied botany. A first circular giving information on program, accommodation, exursions, and other detail will be available early in 1958. This circular and subsequent circulars including application forms will be sent only to those who write to the Secretary-General asking to be placed on the Congress mailing list:

Dr. C. FRANKTON
Secretary-General
IX International Botanical Congress
Science Service Building
Ottawa, Ontario
Canada

Verlag: Paul Parey, (1) Berlin SW 61, Lindenstr. 44-47, Tel. 61 44 68/69. Herausgeber: Prof. Dr. E. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstr. 2, Prof. Dr. M. Klinkowski, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. Richter, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Straße 19. Printed in Germany. Druck von A. W. Hayn's Erben, Berlin SO 36.
  — Erscheinungsweise: Jährlich etwa 10—12 Hefte (4 Hefte = 1 Band).